



**VALIDASI METODE DAN PENGARUH FERMENTASI
KOMBINASI *Aspergillus oryzae* DAN *Rhizopus oligosporus*
TERHADAP KADAR DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max* L.)
MENGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Oleh:

Fanitika Imansari

NIM 142210101035

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**VALIDASI METODE DAN PENGARUH FERMENTASI
KOMBINASI *Aspergillus oryzae* DAN *Rhizopus oligosporus*
TERHADAP KADAR DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max* L.)
MENGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan program strata satu pada Fakultas Farmasi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Fanita Imansari

NIM 142210101035

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

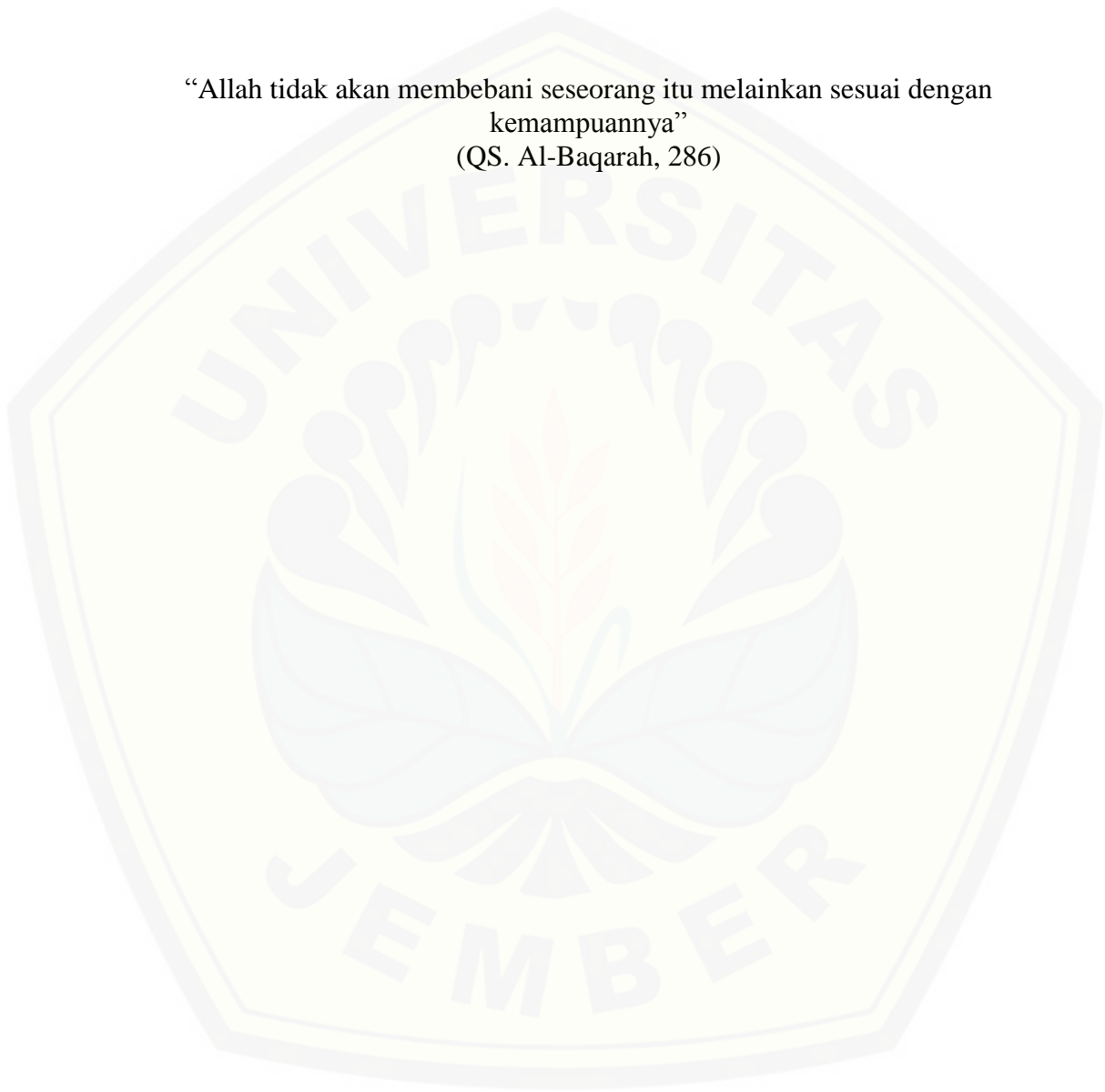
Persembahan ini saya persembahkan untuk:

1. Allah subhanahu wa ta'ala dan Nabi Muhammad shallallahu alaihi wassalam;
2. Orang tua tercinta, bapak Eko Suyitno, S. Pd dan ibu Yuni Erawati yang selalu memberikan doa, semangat dan nasihat kepada saya agar berhasil menjadi seseorang yang lebih baik;
3. Adik tersayang Afifah Dwi Cahyani yang juga selalu memberikan semangat, dukungan dan bantuan selama ini;
4. Para pengajar saya sejak Taman Kanak-kanak sampai Perguruan Tinggi yang terhormat, yang telah memberikan ilmunya dan memberikan bimbingan kepada saya dengan penuh kasih sayang;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“Kalau mereka bisa mengerjakannya, kenapa aku tidak?”

“Allah tidak akan membebani seseorang itu melainkan sesuai dengan kemampuannya”
(QS. Al-Baqarah, 286)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fanitika Imansari

NIM : 142210101035

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Validasi Metode dan Pengaruh Fermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max* L.) Menggunakan KLT-Densitometri" adalah benar-benar hasil karya diri sendiri, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan yang dibuat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Juli 2018

Yang menyatakan

Fanitika Imansari

NIM 142210101035

SKRIPSI

**VALIDASI METODE DAN PENGARUH FERMENTASI
KOMBINASI *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*
TERHADAP KADAR DAIDZEIN EDAMAME (*Glycine max* L.)
MENGUNAKAN KLT-DENSITOMETRI**

Oleh

Fanita Imansari

142210101035

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Endah Puspitasari, S. Farm., M.Sc., Apt

Dosen Pembimbing Anggota : Indah Yulia Ningsih, S. Farm., M. Farm., Apt

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Validasi Metode dan Pengaruh Fermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max* L.) Menggunakan KLT-Densitometri” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Kamis, 19 Juli 2018

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,



Endah Puspitasari, S. Farm., M. Sc., Apt
NIP 198107232006042002

Bawon Triatmoko, S. Farm., M. Sc., Apt
NIP 198201292009121003

Anggota II,

Anggota III,

Indah Yulia N., S. Farm., M. Farm., Apt
NIP 198307122008122002

Dewi Dianasari, S. Farm., M. Farm., Apt
NIP 198712082014042002

Mengesahkan
Dekan

Lestyo Wulandari, S. Si., M. Sc., Apt
NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Validasi Metode dan Pengaruh Fermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max* L.) Menggunakan KLT-Densitometri: Fanitika Imansari, 142210101035; 2018; 54 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Menopause adalah suatu fase dimana keseimbangan hormon didalam tubuh mulai terganggu. Gejala menopause sering terjadi pada wanita berusia 45-55 tahun. Salah satu cara untuk mengatasi gejala menopause adalah *hormone therapy* dengan efek samping serius yang dapat terjadi. Maka alternatif lain yang dapat digunakan adalah mengonsumsi isoflavon dan kandungan isoflavon paling tinggi terdapat pada tanaman kedelai atau edamame.

Edamame adalah tanaman yang berasal dari Jepang dan merupakan spesies dari kedelai. Kandungan isoflavon utama pada kedelai adalah bentuk glikosidanya (genistin, daidzin, dan glisitin) dan sedikit dalam bentuk aglikon (genistein, daidzein, dan glisitein). Adanya proses fermentasi dapat meningkatkan kandungan isoflavon aglikon pada kedelai. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui validitas metode analisis dan pengaruh fermentasi edamame menggunakan kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*.

Tahap awal yang dilakukan adalah preparasi sampel yang terdiri dari edamame non-fermentasi dan terfermentasi hari ke-1, 2, 3, dan 4. Kemudian dilakukan validasi metode terhadap metode yang akan digunakan dan dilanjutkan dengan penetapan kadar daidzein pada ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi.

Hasil optimasi kondisi analisis menunjukkan bahwa pelarut yang digunakan adalah metanol p.a; fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄; fase gerak yang digunakan adalah kombinasi *n*-heksana : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15); panjang gelombang optimum 273 nm; dan konsentrasi uji yang digunakan adalah 0,12 g/ mL.

Validitas metode analisis yang digunakan tidak valid karena tidak dapat memenuhi parameter selektivitas yaitu resolusi sebesar 0,88 dan 1,22. Validasi yang dilakukan memenuhi parameter linieritas dengan nilai r sebesar 0,991, V_{x0} sebesar 3,068% dan X_p sebesar 55,675; memenuhi parameter LOD dan LOQ dengan nilai r sebesar 0,988, V_{x0} sebesar 4,628% dan X_p 23,694, nilai LOD sebesar 20,262 ng sedangkan LOQ sebesar 60,787 ng; memenuhi persyaratan presisi dengan nilai RSD kurang dari 5,3%; memenuhi persyaratan akurasi dengan nilai *recovery* memenuhi rentang 90-107%. Kadar daidzein yang didapatkan pada penetapan kadar daidzein ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi berturut-turut adalah $0,0354 \pm 1,49 \times 10^{-3}$; $0,0099 \pm 1,19 \times 10^{-3}$; $0,0118 \pm 0,65 \times 10^{-3}$; $0,0618 \pm 10,64 \times 10^{-3}$ (b/b).

Hasil analisis statistik uji Mann-Whitney menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara edamame non-fermentasi dengan edamame terfermentasi hari ke-4 dengan nilai $P < 0,05$. Hal ini dapat menunjukkan bahwa kadar daidzein pada ekstrak edamame yang difermentasi menggunakan kombinasi jamur *A. oryzae* dan *R. oligosporus* lebih tinggi dibandingkan dengan edamame non-fermentasi.

PRAKATA

Bismillahirrohmanirohim

Puji syukur kehadiran Allah subhanahu wa ta'ala karena atas segala limpah rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Metode dan Pengaruh Fermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max* L.) Menggunakan KLT-Densitometri”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Dengan terselesaikannya skripsi ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada pihak-pihak yang telah mendukung terselesaikannya skripsi ini, yaitu:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari, S. Si., M. Farm., Apt. yang telah memberikan penulis kesempatan untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Ibu Endah Puspitasari, S. Farm., M. Sc., Apt. dan Ibu Indah Yulia Ningsih, S. Farm., M. Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran tenaga dan perhatiannya dengan penuh kesabaran memberikan ilmu, pengalaman berharga, pengarahan, bimbingan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Ibu Endah Puspitasari, S. Farm., M. Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah sabar memberi semangat dan saran kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
4. Bapak Bawon Triatmoko, S. Farm., M. Sc., Apt dan Ibu Dewi Dianasari, S. Farm., M. Farm., Apt selaku Dosen Penguji yang dengan sabar memberikan saran untuk penulis;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu, pengalaman dan saran kepada penulis selama masa perkuliahan, staff dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;

6. Orang tua tersayang, Ayah Eko Suyitno dan Mama Yuni Erawati serta adik kecil saya Afifah Dwi Cahyani yang senantiasa memberikan kasih sayang, semangat, nasihat dan motivasi untuk penulis;
7. Sahabat seperjuangan *Edamame Squad*, Tatik, Nadia, Yogi, Mace, Vita, yang telah menemani hari-hari penulis dan siap membantu penulis;
8. Teman-teman *Biologi squad*, Illa, Bundo dan Hilda yang siap membantu penulis dan siap berbagi cerita dengan penulis;
9. Teknisi laboratorium Biologi dan Kimia, Bu Widi, Mbak Parka dan Bu Wayan atas bantuannya selama ini;
10. Teman-teman *Calon pendamping dokter*, Luna, Ulfa, Mades, Nina, Devi dan Cahyanti yang telah menemani penulis selama perkuliahan;
11. Teman-teman *Mending Jomblo*, Catur dan Inasa yang telah menemani hari-hari penulis dalam suka dan duka dari awal perkuliahan sampai saat ini;
12. Sahabat dan keluarga angkatan 2014 “PHARMAGEN” Gold Generation!!
13. Serta semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas bantuan dan perhatiannya baik langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan skripsi ini;

Penulis juga menampung segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 19 Juli 2018

Yang menyatakan

Fanitika Imansari

NIM 142210101035

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR PERSAMAAN	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan tentang Edamame	5
2.2 Tinjauan tentang Isoflavon	7
2.3 Tinjauan tentang Daidzein	8
2.4 Tinjauan tentang Fermentasi	9
2.5 Tinjauan tentang Pengaruh Fermentasi terhadap Isoflavon	12
2.6 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis	13
2.7 Tinjauan tentang Densitometri	15
2.8 Optimasi Kondisi Analisis	17
2.9 Tinjauan tentang Validasi Metode	18

2.9.1	Linieritas	19
2.9.2	Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)	19
2.9.3	Selektivitas dan Spesifisitas	20
2.9.4	Presisi	20
2.9.5	Akurasi	21
BAB 3. METODE PENELITIAN		23
3.1	Jenis Penelitian	23
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.3	Rancangan Penelitian.....	23
3.3.1	Rancangan Operasional.....	24
3.3.2	Definisi Operasional.....	24
3.4	Variabel Penelitian	24
3.4.1	Variabel Bebas	24
3.4.2	Variabel Terikat	24
3.4.3	Variabel Terkendali.....	25
3.5	Alat dan Bahan	25
3.5.1	Alat.....	25
3.5.2	Bahan.....	25
3.6	Prosedur Penelitian	25
3.6.1	Preparasi Edamame Non-Fermentasi.....	25
3.6.2	Peremajaan Isolat <i>A. oryzae</i>	26
3.6.3	Peremajaan Isolat <i>R. oligosporus</i>	26
3.6.4	Pembuatan Suspensi Spora <i>A. oryzae</i> dan <i>R. oligosporus</i>	26
3.6.5	Perhitungan Kepadatan Spora	26
3.6.6	Preparasi Edamame Fermentasi	28
3.6.7	Penghilangan Lemak (<i>Defatting</i>).....	28
3.6.8	Pembuatan Ekstrak Edamame.....	28
3.6.9	Optimasi Kondisi Analisis	29
3.6.10	Validasi Metode Analisis	30
3.6.11	Penetapan Kadar Daidzein	32
3.6.12	Analisis Data	32
3.7	Skema Penelitian	34
3.7.1	Pembuatan Ekstrak Edamame Non-fermentasi dan Fermentasi	34
3.7.2	Validasi Metode dan Penetapan Kadar Daidzein.....	35

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Karakterisasi Edamame Terfermentasi	36
4.2 Hasil Rendemen Ekstrak	36
4.3 Optimasi Kondisi Analisis	37
4.3.1 Optimasi Eluen.....	37
4.3.2 Optimasi Panjang Gelombang.....	38
4.3.3 Optimasi Konsentrasi Uji.....	39
4.4 Validasi Metode	40
4.4.1 Linieritas	40
4.4.2 Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)	40
4.4.3 Selektivitas dan Spesifisitas	41
4.4.4 Presisi	43
4.4.5 Akurasi	43
4.5 Penetapan Kadar Daidzein pada Ekstrak Edamame	45
BAB 5. PENUTUP	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	57

DAFTAR GAMBAR

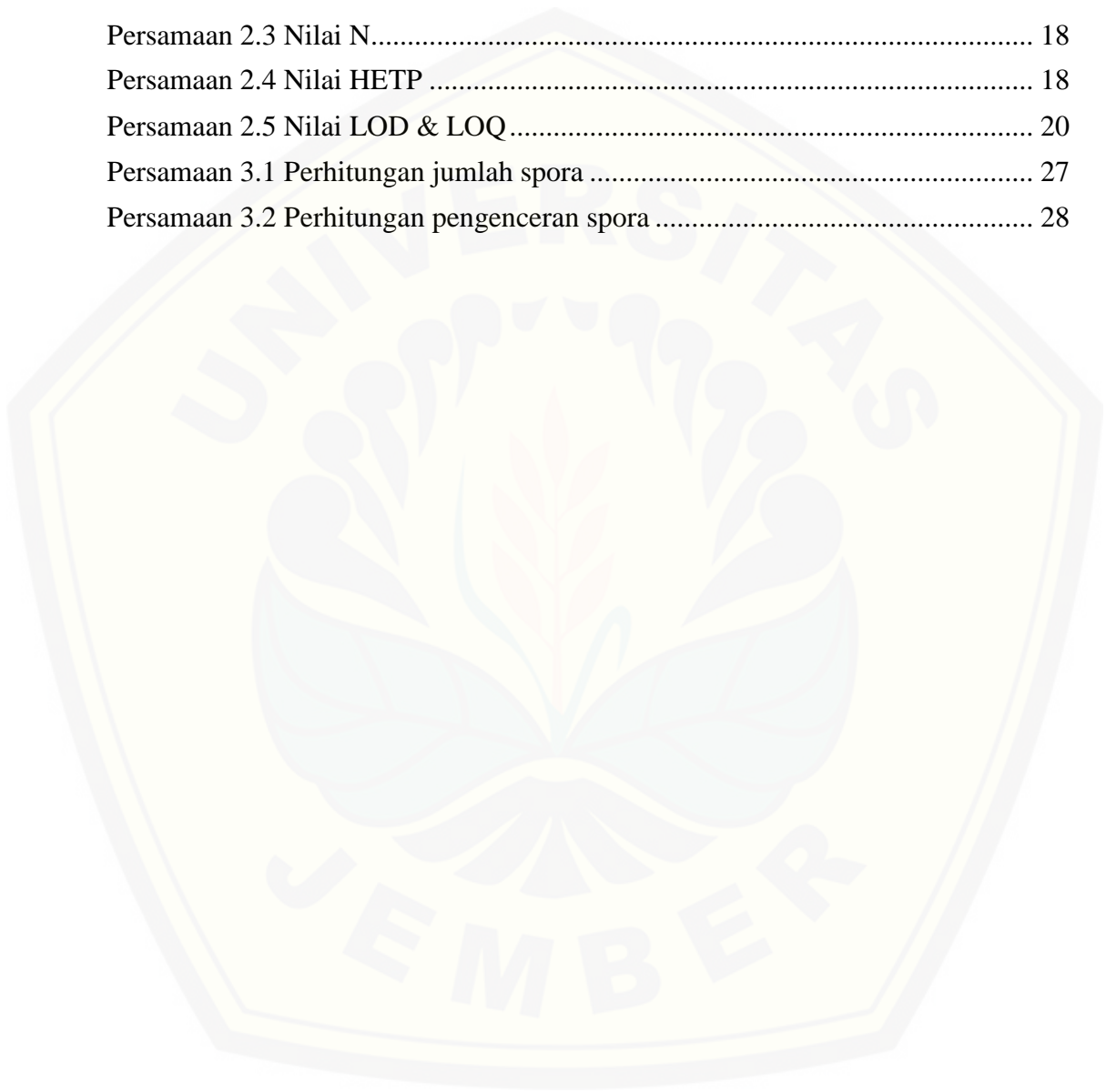
	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman edamame.....	6
Gambar 2.2 Struktur daidzein	9
Gambar 2.3 Perubahan struktur daidzin menjadi daidzein	13
Gambar 2.4 Sistem optik densitometer	16
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian.....	23
Gambar 3.2 Kamar hitung haemasitometer	27
Gambar 3.3 Cara menghitung spora menggunakan hemasitometer.....	27
Gambar 4.1 Karakteristik edamame non-fermentasi dan fermentasi.....	36
Gambar 4.2 Spektra daidzein pada panjang gelombang 200-400 nm.....	39
Gambar 4.3 Kromatogram pemisahan daidzein terhadap glisitein dan genistein .	42
Gambar 4.4 Hasil spektra uji <i>purity</i> dan <i>identity</i>	42
Gambar 4.5 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame terfermentasi.....	45
Gambar 4.6 Hasil eluasi lempeng KLT ekstrak edamame non-fermentasi	46
Gambar 4.7 Hasil penetapan kadar ekstrak edamame	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan nutrisi edamame.....	7
Tabel 2.2 Klasifikasi fitoestrogen	8
Tabel 2.3 Kriteria penerimaan presisi	21
Tabel 2.4 Kriteria penerimaan akurasi	22
Tabel 4.1 Karakteristik edamame non-fermentasi dan fermentasi.....	37
Tabel 4.2 Hasil rendemen ekstrak edamame non-fermentasi dan fermentasi.....	37
Tabel 4.3 Perbandingan nilai N, nilai H dan nilai Rs pada eluen	38
Tabel 4.4 Perbandingan nilai N dan H pada konsentrasi uji yang berbeda	39
Tabel 4.5 Kondisi analisis yang digunakan.....	40
Tabel 4.6 Hasil uji purity	43
Tabel 4.7 Hasil uji <i>identity</i>	43
Tabel 4.8 Hasil uji repeatabilitas.....	43
Tabel 4.9 Hasil uji presisi antara.....	44
Tabel 4.10 Hasil uji akurasi	44

DAFTAR PERSAMAAN

	Halaman
Persamaan 2.1 Perhitungan R_f	14
Persamaan 2.2 Nilai R_s	17
Persamaan 2.3 Nilai N	18
Persamaan 2.4 Nilai HETP	18
Persamaan 2.5 Nilai LOD & LOQ.....	20
Persamaan 3.1 Perhitungan jumlah spora	27
Persamaan 3.2 Perhitungan pengenceran spora	28



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. 1 Perhitungan Kepadatan Suspensi Spora <i>Rhizopus oligosporus</i>	57
A. 2 Perhitungan Kepadatan Suspensi Spora <i>Aspergillus oryzae</i>	57
A. 3 Pengenceran Suspensi Spora.....	58
A. 4 Perhitungan Rendemen Ekstrak	58
A. 5 Pengenceran Standar Daidzein.....	59
B. 1 Optimasi Eluen	60
B. 2 Optimasi Konsentrasi Uji	62
B. 3 Resolusi puncak daidzein	63
B. 4 Data presisi	64
B. 5 Data Akurasi.....	68
B. 6 Penetapan kadar daidzein	70
B. 7 Hasil data ANOVA.....	73

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menopause adalah suatu fase dimana keseimbangan hormon di dalam tubuh mulai berubah. Menopause terjadi ketika hormon estrogen dan progesteron mengalami penurunan dan biasanya terjadi pada usia 45-55 tahun (Durward, 2017). Gejala-gejala yang muncul pada saat menopause adalah berkurangnya waktu tidur, muncul keringat di malam hari, perubahan mood, rasa panas (*Hot flashes*) (Segal dan Mastroianni, 2003) dan adanya perubahan siklus menstruasi (Durward, 2017). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2017) menyebutkan bahwa terjadi peningkatan jumlah penduduk di Indonesia dari tahun 2012 sampai 2016 yaitu dari 3,59 juta per tahun menjadi 3,70 juta per tahun dengan jumlah wanita yang berumur 45-55 tahun sebanyak 5 juta-10 juta penduduk (Kemenkes RI, 2017). Dilihat dari jumlah penduduknya, Indonesia merupakan negara yang mempunyai tingkat kejadian menopause yang tinggi.

Salah satu cara untuk mengurangi gejala yang muncul pada menopause adalah *hormone therapy*. Estrogen yang terkandung dalam *hormone therapy* dapat mengganti hormon estrogen yang hilang di dalam tubuh (Sturdee, 2004). Efek samping yang dapat timbul akibat penggunaan *hormone therapy* adalah meningkatnya risiko menderita penyakit hati koroner, kanker payudara, stroke, dan emboli paru (Varney dkk., 2004). Alternatif lain yang dapat digunakan untuk mengurangi efek samping yang dapat terjadi adalah mengonsumsi isoflavon sebagai *hormone therapy* karena isoflavon dapat meningkatkan indeks gen yang menghasilkan estrogen (Seidlova-Wuttke dkk., 2013). Salah satu tanaman yang mempunyai kandungan isoflavon yang paling tinggi adalah tanaman kedelai atau edamame (Liggins dkk., 2002).

Edamame (*Glycine max*) atau dikenal dengan nama kedelai sayuran hijau adalah tanaman yang berasal dari Jepang dan merupakan spesies dari kedelai yang dapat digunakan sebagai sayuran dan bijinya dapat dimasak baik dengan polongnya maupun tidak (Shurtleff dan Aoyagi, 2009). Edamame mempunyai

kandungan gizi yang sama dengan kedelai (Born, 2006). Produksi edamame di daerah Jember sangatlah melimpah yaitu sebesar 27.732 ton pada tahun 2013, sehingga dapat dengan mudah ditemukan (Setiawan, 2014). Kandungan edamame yang memiliki aktivitas estrogenik adalah isoflavon (Kim dan Park, 2012).

Isoflavon adalah suatu senyawa fitoestrogen yang banyak ditemukan pada buah-buahan, sayuran, dan biji-bijian (Preedy, 2013). Terdapat 4 bentuk isoflavon pada kedelai yaitu bentuk aglikon, bentuk glikosida, bentuk asetilglikosida, dan bentuk malonilglikosida (Astuti, 2008). Kandungan isoflavon utama pada kedelai adalah bentuk glikosida (genistin, daidzin dan glisitin) dan sedikit dalam bentuk aglikon (genistein, daidzein, dan glisitein). Daidzein merupakan kandungan isoflavon terbesar kedua setelah genistein yang terkandung dalam tempe kedelai (Murphy dkk., 2002). Salah satu proses yang dapat mengubah bentuk glikosida menjadi aglikon adalah proses fermentasi (Preedy, 2013).

Fermentasi adalah proses perubahan gula menjadi alkohol (Pratiwi, 2008). Salah satu contoh produk hasil fermentasi adalah tempe. Tempe terbuat dari biji kedelai yang diproses melalui fermentasi, sehingga terjadi penguraian suatu senyawa menjadi senyawa yang sederhana (Badan Standardisasi Nasional, 2012). Isoflavon aglikon dihasilkan dari adanya aktivitas enzim β -glukosidase yang berasal dari mikroba hidup pada kedelai (Purwoko, 2004).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kedelai yang difermentasi menggunakan *Aspergillus oryzae* dan kedelai yang difermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon pada tempe. Penelitian yang dilakukan oleh Yunindarwati dkk. (2016) menunjukkan bahwa kedelai yang difermentasi menggunakan *Aspergillus oryzae* dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon sampai hari ketiga fermentasi dengan jumlah peningkatan isoflavon aglikon sebesar 27,91 kali kedelai non-fermentasi. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Praharani (2015) menunjukkan bahwa kedelai yang difermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* dapat meningkatkan kadar isoflavon aglikon sampai fermentasi hari ketiga dengan jumlah peningkatan isoflavon sebesar 12,759 kali kedelai non-fermentasi.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-densitometri. KLT adalah suatu teknik yang paling banyak digunakan untuk analisis kualitatif bagi senyawa organik, analisis kuantitatif dan isolasi senyawa individu dari suatu campuran multikomponen. KLT dapat digunakan bersamaan dengan densitometri untuk analisis kuantitatif karena metode tersebut dapat mendeteksi zona warna, menyerap sinar UV atau zona fluoresen menggunakan *scanning* kromatogram (Waksmundzka-Hajnos dkk., 2008). Metode KLT-densitometri mempunyai kelebihan yaitu relatif sederhana, tidak mahal dan dapat memisahkan suatu senyawa yang diinginkan dari senyawa lain dengan menggunakan fase gerak yang tepat (Hilmi dan Darmawati, 2013). Untuk mendapatkan suatu metode KLT-densitometri yang parameter kerjanya dapat mengatasi suatu permasalahan analisis, maka perlu dilakukan validasi metode (Gandjar dan Rohman, 2007).

Berdasarkan penelusuran pustaka yang telah dilakukan, belum ada penelitian mengenai kandungan isoflavon aglikon daidzein, pada tempe yang terbuat dari edamame dan difermentasi menggunakan kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*. Untuk mengetahui jumlah isoflavon aglikon tersebut dalam tempe edamame digunakan metode KLT-densitometri. Validasi metode KLT-densitometri dilakukan sebelum menentukan kadar isoflavon aglikon pada tempe.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan, maka didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Bagaimanakah kondisi optimum yang diperoleh untuk penetapan kadar daidzein ekstrak edamame menggunakan metode KLT-Densitometri?
- b. Bagaimanakah validitas metode KLT-densitometri yang digunakan untuk penetapan kadar daidzein ekstrak edamame yang meliputi parameter linieritas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ), selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi?

- c. Bagaimanakah pengaruh fermentasi kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* terhadap kadar daidzein ekstrak edamame?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk menjawab rumusan masalah yang ada, yaitu:

- a. Mengetahui kondisi optimum untuk penetapan kadar daidzein ekstrak edamame menggunakan metode KLT-densitometri.
- b. Mengetahui validitas metode KLT-densitometri untuk penetapan kadar daidzein ekstrak edamame yang meliputi parameter linearitas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ), selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi.
- c. Mengetahui pengaruh fermentasi kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* terhadap kadar daidzein ekstrak edamame.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan dari penelitian yang dilakukan yaitu sebagai berikut:

- a. Memberikan suatu metode KLT-densitometri yang telah divalidasi sehingga dapat digunakan untuk menghitung kadar daidzein yang terdapat pada tempe yang terbuat dari edamame dan difermentasi menggunakan kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*
- b. Memberikan informasi terhadap kadar daidzein pada edamame yang difermentasi menggunakan kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* yang nantinya dapat digunakan untuk keperluan penelitian lainnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Edamame

Edamame adalah spesies dari kedelai (*Glycine max*) yang dipanen pada saat biji belum matang dan telah memenuhi polong sampai 80-90% dan sering digunakan sebagai sayuran. Edamame dipanen pada hari ke 99 sampai 120 hari setelah penanaman. waktu yang tepat untuk memanen edamame adalah pada saat polongnya masih hijau, tidak matang dan bijinya berwarna hijau muda (Konovsky dkk., 1994).

Klasifikasi edamame dalam taksonomi adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: <i>Glycine</i> Wild
Spesies	: <i>Glycine max</i> L. (USDA, tanpa tahun)

Tanaman edamame mempunyai bentuk batang yang tegak dan merambat, berdaun tiga dan mempunyai anak daun yang berbentuk bulat telur, bunganya mempunyai bentuk seperti kupu-kupu dengan warna putih atau ungu (Gambar 2.1a), bentuk polong bulat dengan warna hijau muda terang sampai hijau tua, panjang polong sebesar 6-7 cm dengan biji berisi 2-4 biji setiap polongnya, biji yang telah tua berwarna coklat muda dengan bentuk bulat panjang (Gambar 2.1b) (Widati dan Hidayat, 2012).



(a)



(b)

Gambar 2.1 Tanaman edamame (a) seluruh tanaman edamame (Born, 2006) (b) biji edamame (dokumentasi pribadi)

Manfaat dari mengonsumsi kedelai adalah dapat mencegah dan mengobati penyakit kronik seperti menurunkan risiko penyakit hati, kanker payudara dan kanker prostat. Kedelai juga dapat mempengaruhi fungsi ginjal, mengurangi gejala depresi dan memperbaiki kesehatan kulit. Kandungan terbesar yang terdapat pada kedelai adalah kandungan isoflavon (Messina, 2016).

Edamame memiliki biji yang lebih besar, lebih ringan, lebih lembut dan mempunyai kandungan senyawa penghasil gas yang lebih sedikit dibandingkan dengan kedelai (Born, 2006). Edamame mengandung energi sebesar 110 kkal, protein 8 g, total lemak 3,5 g, karbohidrat 12 g, serat 5 g, gula 2 g, kalsium 80 mg, dan besi sebesar 2,7 mg (USDA, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Murphy

(2002) menyatakan bahwa tempe kedelai yang diekstraksi menggunakan etanol mempunyai kandungan isoflavon total sebesar 6,161 $\mu\text{mol/g}$, dengan jumlah genistein sebesar 3,737, daidzein 2,185, dan glisitein sebesar 0,239 $\mu\text{mol/g}$ (Murphy dkk., 2002).

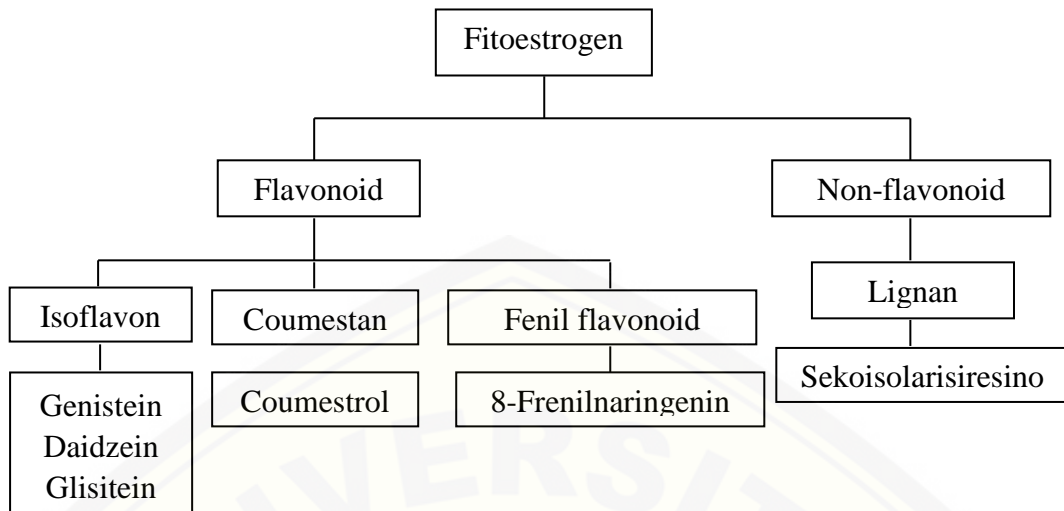
Tabel 2.1 Kandungan nutrisi edamame (USDA, 2017)

Nutrisi	Unit	Kandungan per 85 g	Nilai per 100 g
Energi	kcal	110	129
Protein	g	8,00	9,14
Total lemak	g	3,50	4,12
Karbohidrat	g	12,00	14,12
Serat	g	5,0	5,9
Gula	g	2,00	2,35
Kalsium	mg	80	94
Besi	mg	2,70	3,18

2.2 Tinjauan tentang Isoflavon

Fitoestrogen adalah komponen estrogenik yang terdapat secara alami pada tumbuhan. Komponen-komponen tersebut adalah isoflavon, *coumestan*, dan lignan (Gambar 2.2). Di antara tiga komponen tersebut isoflavon adalah senyawa yang paling sering diteliti, dimana komponen ini paling besar terdapat pada kedelai. Fitoestrogen mempunyai struktur yang mirip dengan estrogen, sehingga mempunyai aktivitas sebagai reseptor estrogen agonis atau antagonis (Kim dan Park, 2012).

Terdapat 2 tipe reseptor estrogen yang ditemukan pada jaringan yaitu $\text{ER}\alpha$ (*Estrogen Receptor α*) dan $\text{ER}\beta$ (*Estrogen Receptor β*). Isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen karena isoflavon mempunyai 2 cincin fenolik. Ikatan afinitas isoflavon terhadap reseptor estrogen tidak sebesar ikatan antara 17β -estradiol dengan reseptor estrogen, tetapi isoflavon dapat bersaing dengan 17β -estradiol untuk berikatan dengan estrogen. Derajat ikatan daidzein untuk $\text{ER}\alpha$ adalah 0,1% dan untuk $\text{ER}\beta$ adalah 0,5% (Kim dan Park, 2012).



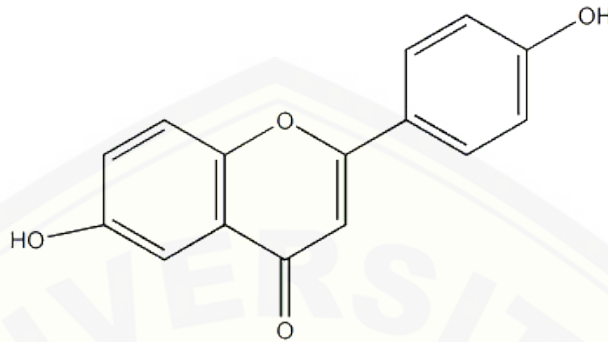
Tabel 2.2 Klasifikasi fitoestrogen (Kim dan Park, 2012)

Kandungan isoflavon dalam kedelai adalah aglikon (daidzein, genistein dan glisitein), glukosida (daidzin, genistin dan glisitin), asetilglukosida (asetildaizidin, asetilgenistin dan asetilglisitin), dan malonilglukosida (malonildaizidin, malonilgenistin dan malonilglisitin) (Messina, 2016). Kandungan isoflavon pada kedelai mempunyai aktivitas fisiologi, misalnya dapat menurunkan risiko kanker, meningkatkan densitas tulang, dan sebagai anti radiasi UVb. Isoflavon juga dapat meningkatkan kemampuan belajar dan mengingat pada wanita yang telah menopause, serta dapat menurunkan konsentrasi kolesterol plasma yang berpengaruh terhadap penyakit hati koroner, menghasilkan senyawa antidiabetes, dan memodulasi reseptor yang berperan pada penyakit *Kawasaki* (Wang dkk., 2013).

2.3 Tinjauan tentang Daidzein

Terdapat tiga jenis isoflavon yang terkandung pada edamame, yaitu daidzein, genistein dan glisitein (Kim dan Park, 2012). Jumlah kadar isoflavon tidak selalu dipengaruhi oleh manajemen agrikultur, tetapi daidzein lebih sensitif terhadap manajemen agrikultur dibandingkan dengan genistein (Laurenz dkk., 2017). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan bahwa diantara 36 sampel kacang-kacangan dan buah, kandungan daidzein dan genistein pada kedelai

mempunyai kadar yang paling tinggi yaitu 3.8×10^6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ berat basah kedelai (Liggins dkk., 2002). Daidzein adalah senyawa terbesar kedua setelah genistein yang terkandung dalam edamame (Murphy dkk., 2002).



Gambar 2.2 Struktur daidzein (Kim dan Park, 2012)

2.4 Tinjauan tentang Fermentasi

Fermentasi berasal dari bahasa latin yaitu *fervere* yang memiliki arti adanya aksi dari ragi pada ekstrak buah atau pada biji-bijian. Gula yang ada pada ekstrak akan menghasilkan gelembung karbon dioksida yang berasal dari katabolisme anaerobik, sehingga menghasilkan panas. Pengertian fermentasi menurut biokimia adalah adanya energi yang berasal dari katabolisme komponen organik (Stanbury dkk., 2013). Untuk melakukan proses fermentasi dapat digunakan mikroorganisme yang disebut dengan *yeast* (Pratiwi, 2008).

Kapang adalah mikroorganisme multiseluler yang dapat tumbuh pada makanan yang berbentuk seperti kapas dan dapat diamati dengan mata. Struktur yang menyerupai kapas tersebut adalah miselium. Miselium tersusun atas filamen yang berbentuk seperti benang-benang dan sering disebut dengan hifa. Terdapat dua jenis hifa, yaitu hifa yang memiliki dinding pembatas dan yang tidak mempunyai dinding pembatas (Fardiaz, 1992). Salah satu jenis kapang yang dapat digunakan untuk proses fermentasi adalah *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*.

a. *A. oryzae*

A. oryzae adalah sejenis jamur yang biasa digunakan di Jepang untuk memfermentasi kecap, sake dan cuka. *A. oryzae* memiliki filamen yang memiliki enzim yang berasal dari produksi sekret. *A. oryzae* pertama kali diisolasi oleh H.Ahlburg pada tahun 1876 dari koji. Nama awal jamur ini adalah *Eutorium oryzae* yang selanjutnya oleh F. Cohn diubah menjadi *A. oryzae* (Machida dkk., 2008).

Klasifikasi dari jamur *A. oryzae* yaitu:

Kingdom	: Fungi
Subkingdom	: Dikarya
Filum	: Ascomycota
Subfilum	: Pezizomycotina
Kelas	: Eurotiomycetes
Subkelas	: Eurotiomycetidae
Ordo	: Eurotiales
Family	: Aspergillaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) Cohn

(NZOR, tanpa tahun)

b. *R. oligosporus*

R. oligosporus merupakan jenis jamur yang paling banyak digunakan untuk membuat tempe. Jamur ini tumbuh dengan koloni berwarna abu-abu kecoklatan dengan tinggi ± 1 mm. Diameter sporangiosfor jamur ini adalah 10-18 μm . Bentuk dari sporangiospora tidak teratur, dapat berbentuk globosa atau elip yang memiliki panjang 7-10 μm (Yusra, Azima F., Novelina, 2014). Sporangiosfor *R. oligosporus* memiliki panjang sekitar 150-400 μm dan sporangium dengan panjang 80-120 μm (Dwinanto, 2011).

Klasifikasi jamur *Rhizopus oligosporus*, yaitu:

Kingdom	: Fungi
Filum	: Mucoromycota

Subfilum : Mucoromycotina
Ordo : Mucorales
Family : Rhizopodaceae
Genus : Rhizopus
Spesies : *Rhizopus microporus* var. *oligosporus* (saito) Schipper & Stalpers

(NZOR, tanpa tahun)

Salah satu contoh produk fermentasi adalah tempe. Tempe adalah makanan tradisional Indonesia yang terbuat dari biji kedelai yang diproses dengan cara fermentasi (Badan Standardisasi Nasional, 2012). Proses fermentasi tempe terjadi pada saat inkubasi. Proses fermentasi tempe terjadi pada tiga fase, yaitu (Durward, 2017):

1. Fase pertumbuhan cepat (0-30 jam)

Pada fase ini terjadi peningkatan jumlah asam lemak bebas, peningkatan suhu, adanya pertumbuhan jamur secara cepat yang ditandai adanya pertumbuhan miselia pada permukaan biji.

2. Fase transisi (30-50 jam)

Fase ini merupakan fase optimal fermentasi tempe. Pada fase ini terjadi penurunan suhu, penurunan jumlah asam lemak bebas dan pertumbuhan jamur hampir sama atau terjadi sedikit peningkatan dibandingkan dengan fase pertama.

3. Fase pembusukan (50-90 jam)

Fase ini juga dikenal dengan fase fermentasi lanjutan. Pada fase ini terjadi peningkatan jumlah bakteri dan asam lemak bebas, penurunan jumlah pertumbuhan jamur dan pada fase tertentu pertumbuhan jamur dapat terhenti serta adanya perubahan bau karena terjadinya proses degradasi protein sehingga menimbulkan bau ammonia.

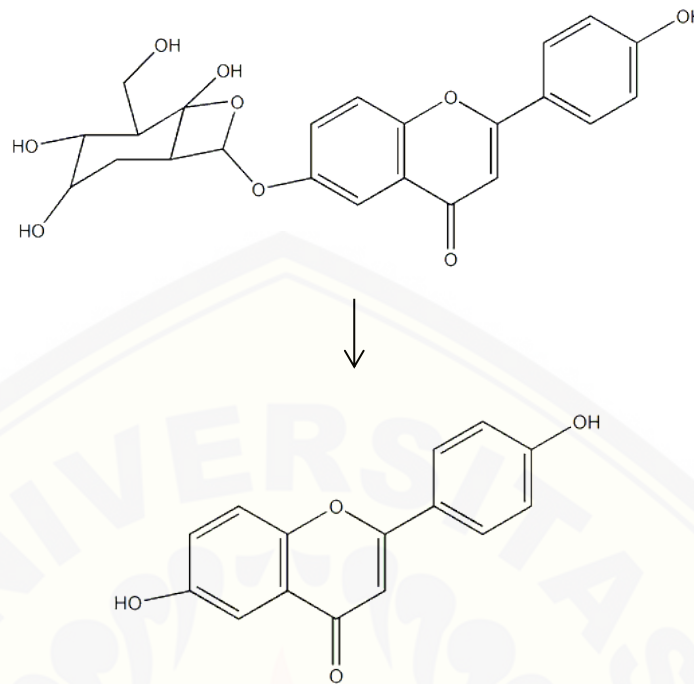
2.5 Tinjauan tentang Pengaruh Fermentasi terhadap Isoflavon

Isoflavon yang ditemukan dalam edamame mempunyai bentuk glikosida dan sedikit yang ditemukan dalam bentuk aglikon. Oleh karena itu, proses fermentasi dilakukan karena dapat mengubah glikosida menjadi aglikon, sehingga kadar aglikon di dalam edamame menjadi bertambah. Proses fermentasi dapat merubah struktur kimia dari glikosida, hidrolisis protein dan hilangnya faktor anti-nutrisi (Preedy, 2013).

Proses perubahan glikosida menjadi aglikon terjadi pada saat perendaman dan fermentasi. Perendaman dilakukan dengan tujuan agar kulit ari pada edamame mudah dilepaskan, sehingga proses fermentasi oleh kapang dapat lebih mudah dilakukan. Pada saat fermentasi, terjadi perubahan bentuk molekul organik yang besar menjadi molekul organik yang lebih kecil. Hal ini menyebabkan edamame menjadi lebih lunak dan mudah dicerna (Purwoko, 2004).

Proses pembentukan isoflavon aglikon terjadi karena adanya hidrolisis isoflavon glikosida (Gambar 2.3). Proses tersebut berlangsung karena adanya enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh kapang yang bertransformasi dari senyawa isoflavon glikosida menjadi senyawa isoflavon aglikon (Nurhidayah, 2017). Glukosa yang terlepas pada saat fermentasi digunakan sebagai sumber energi melalui fermentasi asam laktat (Purwoko, 2004).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan bahwa tempe yang difermentasi menggunakan *R. oligosporus* terjadi peningkatan kandungan isoflavon daidzein pada hari ketiga fermentasi sebanyak 6 kali kandungan tempe non-fermentasi (Kuligowski dkk., 2016). Penelitian lain yang dilakukan oleh Lee (2013) melaporkan bahwa terjadi peningkatan produksi daidzein pada tepung kedelai yang diberikan jamur *A. oryzae* pada 24 jam fermentasi sebesar 56 ± 100 mg/g dengan jumlah awal $8 \pm 0,01$ mg/g (Lee dkk., 2013).



Gambar 2.3 Perubahan struktur daidzin menjadi daidzein (Preedy, 2013)

2.6 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan bentuk kromatografi planar yang paling banyak digunakan karena cara penggunaannya yang sederhana. Alat yang dibutuhkan untuk menggunakan KLT hanya bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Untuk mendapatkan pemisahan yang efisien dan akurat dapat dilakukan dengan cara optimasi metode dan menggunakan suatu instrument komersial (Wulandari, 2016).

Keuntungan lain dari penggunaan kromatografi planar adalah (Gandjar dan Rohman, 2007):

- Metode ini banyak digunakan sebagai metode analisis
- Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi atau dengan radiasi menggunakan sinar UV
- Proses elusi dapat dilakukan dengan cara menaik (*ascending*), menurun (*descending*) atau dengan keduanya

- d. Ketepatan pada saat penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak dari komponen yang tidak bergerak.

Penggunaan metode KLT dilakukan dengan cara menotolkan alikuot sampel dengan totolan tertentu pada salah satu ujung fase diam yang bertujuan untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan yang selanjutnya ujung fase diam yang terdapat totolan alikuot sampel dicelupkan ke dalam fase gerak yang terdapat dalam *chamber*. Selanjutnya campuran komponen sampel akan bergerak dengan kecepatan berbeda-beda dan hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika noda yang bergerak telah sampai pada jarak yang diinginkan, dikeluarkan fase diam dari dalam *chamber* dan dikeringkan. Zona yang dihasilkan dideteksi menggunakan sinar ultraviolet atau secara visual. Identifikasi awal yang dilakukan pada KLT dilihat dari perbandingan nilai R_f sampel dengan nilai R_f standar. Perhitungan nilai R_f ditunjukkan pada Persamaan 2.1 (Wulandari, 2016).

$$R_f = \frac{R_{fsampel}}{R_{fstandar}} \dots \dots \dots (\text{Persamaan 2.1 Perhitungan } R_f)$$

Fase diam yang sering digunakan untuk KLT adalah silika dan serbuk selulosa. Fase diam yang digunakan pada KLT merupakan penjerap yang berukuran kecil dengan diameter antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam maka kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusi akan semakin baik (Gandjar dan Rohman, 2007).

Fase gerak pada KLT yang paling sederhana adalah campuran 2 pelarut organik karena adanya daya elusi campuran sehingga dapat memisahkan secara optimal. Untuk pemisahan yang menggunakan silika gel sebagai fase diamnya maka polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi (Gandjar dan Rohman, 2007).

Terdapat beberapa metode pemisahan pada kromatografi planar, yaitu (Wulandari, 2016):

a. Pemisahan berdasarkan polaritas

Pada metode ini senyawa-senyawa yang terkandung dalam komponen dapat terpisah karena adanya suatu perbedaan polaritas. Afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak mengikuti prinsip *like dissolve like* jadi bergantung dari kedekatan polaritas analit terhadap fase diam dan fase gerak.

b. Pemisahan berdasarkan muatan ion

Faktor-faktor yang mempengaruhi pemisahan dengan metode ini adalah ionisasi senyawa, pH lingkungan dan adanya ion lainnya. Pemisahan ini terjadi karena adanya kompetisi antar senyawa dalam sampel dengan sisi resin yang bermuatan sehingga ion-ion akan bergabung dengan muatan yang berlawanan, hal ini disebut dengan kromatografi penukar ion.

c. Pemisahan berdasarkan ukuran molekul

Pemisahan ini dapat terjadi karena ukuran molekul suatu senyawa dapat mempengaruhi difusi senyawa-senyawa melewati pori-pori fase diam. Senyawa yang memiliki ukuran besar hanya akan berdifusi pada fase diam yang memiliki ukuran pori-pori besar sedangkan senyawa yang memiliki ukuran kecil akan berdifusi ke dalam semua pori-pori fase diam, sehingga terjadi perbedaan kecepatan migrasi senyawa.

d. Pemisahan berdasarkan bentukan spesifik

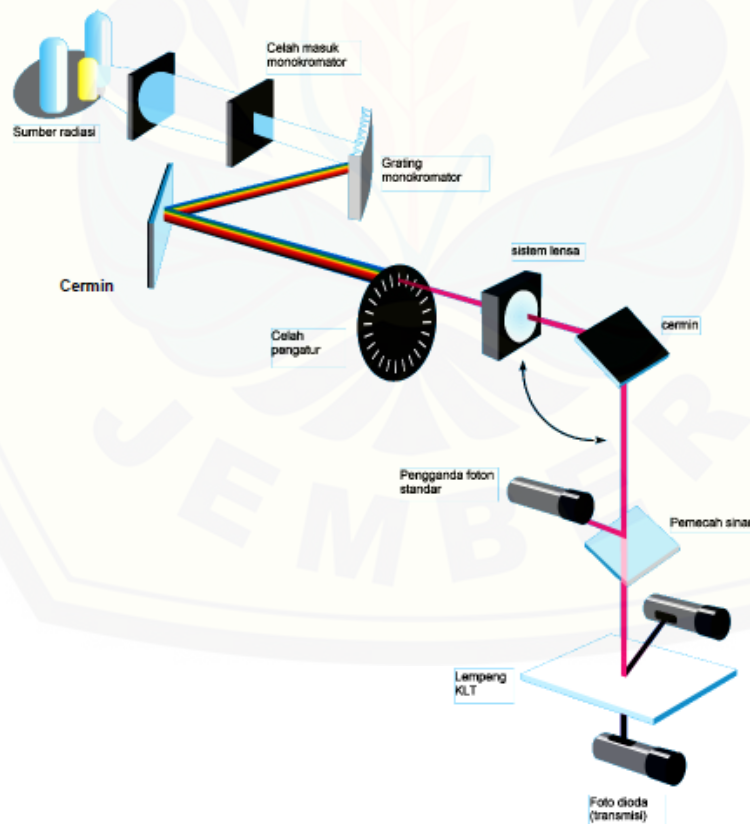
Metode pemisahan ini berdasarkan adanya bentukan spesifik yang melibatkan ikatan kompleks yang spesifik antara senyawa sampel dengan fase diam.

2.7 Tinjauan tentang Densitometri

Analisis kuantitatif untuk KLT dapat dilakukan dengan menggunakan instrumen, yaitu densitometri dan sering disebut dengan KLT-densitometri. Densitometri dapat menentukan analit secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis secara kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan nilai R_f sampel

dengan nilai R_f standar, sedangkan untuk analisis secara kuantitatif dapat dilihat dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standar pada fase diam yang diketahui konsentrasinya (Wulandari, 2016).

Sumber radiasi yang digunakan pada densitometri dapat berupa sinar uv (lampu deuterium), sinar vis (lampu tungsten) dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang berupa sinar polikromatik akan dimasukkan melewati celah monokromator. Selanjutnya sinar akan didispersikan menjadi sinar monokromator. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih akan dipantulkan oleh cermin sehingga akan mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat direfleksikan atau dapat diteruskan. Sinar yang direfleksikan atau diteruskan akan ditangkap oleh pengganda foton (*Photomultiplier*). Elektron dihasilkan dari penggadaan sinar oleh pengganda foton yang dapat terbaca oleh sistem komputer sebagai data output (Wulandari, 2016).



Gambar 2. 4 Sistem optik densitometer (Wulandari, 2016)

2.8 Optimasi Kondisi Analisis

Untuk memperoleh suatu hasil pengukuran yang akurat maka kondisi analisis pada KLT-densitometri perlu dilakukan optimasi kondisi analisis. Optimasi kondisi analisis berupa optimasi eluen, optimasi panjang gelombang dan optimasi konsentrasi uji (Wulandari, 2016).

Optimasi eluen dapat dilakukan dengan cara menentukan sifat fisika dan kimia analit yang akan dianalisis dan jenis fase diam yang akan digunakan. Apabila menggunakan metode pemisahan berdasarkan polaritas maka perlu diketahui nilai koefisien partisi (P atau Log P) dan tetapan disosiasi (pKa) analit. Nilai koefisien partisi digunakan untuk menentukan afinitas analit sedangkan nilai tetapan disosiasi (pKa) digunakan untuk menentukan bentuk analit dalam lingkungan tempat analit (Wulandari, 2016).

Untuk melihat apakah suatu kromatogram telah efisien atau tidak maka dapat dilihat dari beberapa parameter yaitu resolusi (Rs), nilai *theoretical plate*/lempeng teori (N), nilai *height equivalent of teoritical plate* (HETP) dan waktu analisis (t) (Wulandari, 2016).

a. Resolusi (Rs)

Resolusi merupakan suatu kemampuan kondisi analisis untuk memisahkan dua senyawa dalam sampel. Nilai resolusi yang baik adalah lebih dari 1,5. Semakin besar nilai resolusi maka semakin baik pemisahan yang terjadi. Perhitungan resolusi dapat dilakukan menggunakan Persamaan 2.2.

$$Rs = \frac{2[(Z)a-(Z)b]}{(W)a+(W)b} \dots \dots \dots (\text{Persamaan 2.2 Nilai Rs})$$

Dimana :

Rs = pemisahan antara dua puncak kromatogram

Z_a = jarak migrasi zat A

Z_b = jarak migrasi zat B

W_a = lebar dasar puncak zat A

W_b = lebar dasar puncak zat B

(Wulandari, 2016)

b. Nilai *theoretical plate*/ Lempeng teori (N)

Nilai N menunjukkan nilai atau kesetimbangan angka pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam. Perhitungan N dapat dilakukan menggunakan Persamaan 2.3.

$$N = 16 \left(\frac{Z}{W} \right)^2 \dots \dots \dots \text{(Persamaan 2.3 Nilai } N \text{)}$$

Dimana :

N = nilai pelebaran zona

W = lebar dasar puncak

Z = jarak migrasi analit

(Wulandari, 2016)

c. Nilai *Height equivalent of teoritical plate* (HETP)

Nilai HETP merupakan panjang jarak yang ditempuh eluen untuk melakukan satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam. Perhitungan HETP dapat dilakukan menggunakan Persamaan 2.4

$$HETP = \left(\frac{Z}{N} \right)^2 \dots \dots \dots \text{(Persamaan 2.4 Nilai HETP)}$$

Dimana :

HETP = jarak tempuh analit

N = nilai pelebaran zona

Z_f = jarak migrasi fase gerak

(Wulandari, 2016)

2.9 Tinjauan tentang Validasi Metode

Validasi metode bertujuan untuk verifikasi bahwa parameter-parameter kinerja dari suatu metode telah memenuhi untuk mengatasi suatu problem analisis. Suatu metode perlu dilakukan validasi ketika:

- a. Dikembangkannya metode baru untuk mengatasi suatu problem analisis tertentu
- b. Adanya revisi dari suatu metode yang telah baku untuk menyesuaikan perkembangan atau karena adanya suatu masalah yang mengarahkan metode tersebut harus direvisi
- c. Penggunaan suatu metode pada laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda atau dikerjakan oleh alat yang berbeda
- d. Adanya suatu penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku yang digunakan telah berubah seiring berjalannya waktu
- e. Untuk melihat kesetaraan antara metode baru dan metode baku.

(Gandjar dan Rohman, 2007)

Terdapat 5 langkah validasi yang dapat dilakukan untuk validasi metode KLT-densitometri, yaitu linieritas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ), selektivitas dan spesifisitas, presisi, dan akurasi.

2.9.1 Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil yang proporsional dengan konsentrasi analit pada suatu kisaran tertentu. Linieritas menunjukkan hubungan antara respon (y) dan konsentrasi (x) pada kurva kalibrasi (Gandjar dan Rohman, 2007).

Linieritas biasanya dihitung berdasarkan persamaan matematik yang dilihat melalui persamaan garis lurus. Dalam penelitian, konsentrasi yang digunakan dalam satu seri larutan biasanya dalam rentang 50-150% atau 0-200% (Harmita, 2004).

2.9.2 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat terdeteksi. LOD dapat dihitung dengan berdasarkan standar deviasi (SD) dan kemiringan (*slope*). Batas kuantifikasi merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi (Gandjar dan Rohman, 2007). Metode perhitungan LOD dan LOQ dapat didasarkan pada standar deviasi dan *slope* dengan rumus (Persamaan 2.4):

$$Q = \frac{K \times Sb}{s} \dots \dots \dots \text{(Persamaan 2.5 Nilai LOD \& LOQ)}$$

Dimana:

Q = LOD atau LOQ

K = 3 untuk LOD atau 10 untuk LOQ

Sb = simpangan baku

S = slope

(Harmita, 2004)

2.9.3 Selektivitas dan Spesifisitas

Selektivitas atau spesifisitas merupakan kemampuan suatu metode untuk mengukur analit secara tepat dan spesifik. Terdapat dua jenis uji spesifisitas yaitu uji identifikasi dan uji kemurnian. Uji identifikasi bertujuan untuk membedakan antar senyawa yang mempunyai struktur molekul hampir sama, sedangkan uji kemurnian bertujuan untuk pengukuran kadar (Gandjar dan Rohman, 2007).

Selektivitas ditentukan dengan cara membandingkan hasil analisis sampel yang terdapat senyawa asing dengan sampel yang tidak terdapat senyawa asing (standar). Pada metode kromatografi, selektivitas dapat dilihat melalui perhitungan resolusi (R_s) (Harmita, 2004).

2.9.4 Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan suatu metode analisis yang diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel. Presisi sering kali dinyatakan sebagai standar deviasi (SD) atau standar deviasi relatif (RSD). Untuk senyawa yang mempunyai senyawa-senyawa aktif dalam jumlah banyak maka nilai RSD yang diperbolehkan adalah 1-2% sedangkan untuk senyawa yang memiliki jumlah sedikit maka nilai RSD yang diperbolehkan adalah 5-15% (Gandjar dan Rohman, 2007). Hasil presisi harus dibawah rentang penerimaan agar dapat dikatakan hasil yang didapatkan telah presis (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Kriteria penerimaan nilai presisi ditunjukkan oleh Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Kriteria penerimaan studi presisi (Yuwono dan Indrayanto, 2005)

Konsentrasi analit (%)	Unit	Presisi (RSD)
100	100%	1,3
≥ 10	10%	1,9
≥ 1	1%	2,7
$\geq 0,1$	0,1%	3,7
0,01	100 ppm	5,3
0,001	10 ppm	7,3
0,0001	1 ppm	11
0,00001	100 ppb	15
0,000001	10 ppb	21
0,0000001	1 ppb	30

2.9.5 Akurasi

Akurasi merupakan kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima. Untuk melakukan akurasi maka pengumpulan data sebaiknya dilakukan 9 kali penetapan kadar dari 3 konsentrasi analit yang berbeda dan data yang diperoleh dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) (Gandjar dan Rohman, 2007). Persen perolehan kembali adalah perbandingan hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Harmita, 2004). Hasil presisi harus dibawah rentang penerimaan agar dapat dikatakan hasil yang didapatkan telah presis (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Kriteria penerimaan nilai akurasi ditunjukkan pada Tabel 2.4.

Akurasi dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode simulasi (*spicked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku (*standard addition method*) (Harmita, 2004).

a. Metode simulasi

Sejumlah analit murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (placebo) lalu campuran dianalisis dan hasilnya dibandingkan (Harmita, 2004).

b. Metode penambahan baku

Hal yang dilakukan pertama adalah sampel dianalisis lalu ditambahkan analit dengan jumlah tertentu pada sampel lalu dianalisis ulang (Harmita, 2004).

Tabel 2.4 Kriteria penerimaan akurasi (Yuwono dan Indrayanto, 2005)

Konsentrasi analit (%)	Unit	Recovery (%)
100	100%	98-102
≥ 10	10%	98-102
≥ 1	1%	97-103
$\geq 0,1$	0,1%	95-105
0,01	100 ppm	90-107
0,001	10 ppm	80-110
0,0001	1 ppm	80-110
0,00001	100 ppb	80-110
0,000001	10 ppb	60-115
0,0000001	1 ppb	40-120

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

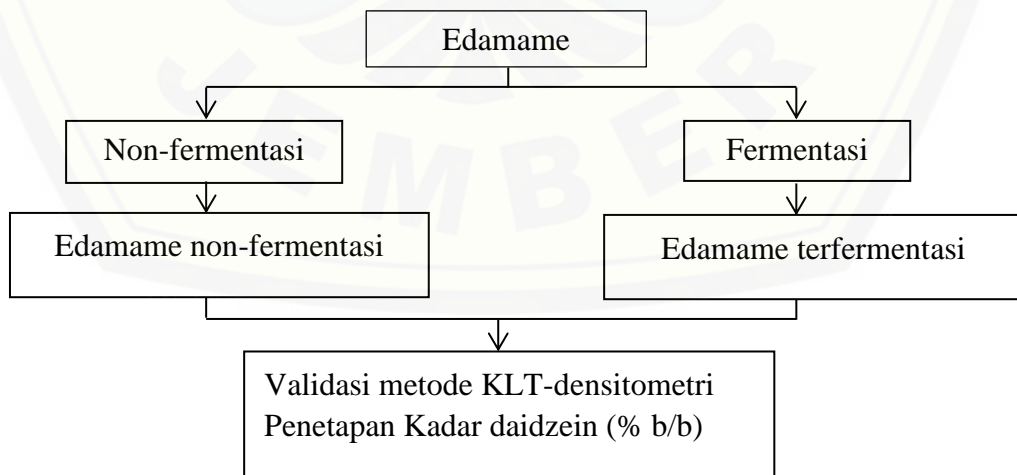
Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental yang termasuk dalam *true experimental laboratories*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar daidzein pada edamame dan mengetahui metode yang digunakan telah valid atau tidak valid.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia serta Laboratorium Bioteknologi dan Mikrobiologi Farmasi, Fakultas Farmasi serta di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Jember pada bulan Januari 2018 sampai dengan Juli 2018.

3.3 Rancangan Penelitian

Secara skema rancangan penelitian digambarkan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.3.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilaksanakan melalui beberapa tahapan, yaitu:

- a. Preparasi sampel edamame non-fermentasi
- b. Pembuatan suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang mengandung 10^6 spora/ mL
- c. Preparasi sampel edamame fermentasi menggunakan campuran *A. oryzae* dan *R. oligosporus*
- d. Ekstraksi sampel edamame menggunakan etanol 70%

3.3.2 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian yang dilakukan sebagai berikut:

- a. Edamame yang digunakan berasal dari PT. Mitra Tani 27, ditanam di daerah Jember, varietas SPM-1, dipanen pada bulan Desember 2017, dipanen 63-68 hari setelah tanam
- b. Isolat *A. oryzae* diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi & Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Jember
- c. Isolat *R. oligosporus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember
- d. Edamame mulai difermentasi pada hari kesatu fermentasi sampai hari keempat fermentasi (H₁, H₂, H₃, dan H₄)

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan fermentasi edamame dan lama waktu fermentasi edamame.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar daidzein dan validasi metode KLT-densitometri pada edamame non-fermentasi dan edamame fermentasi.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kepadatan spora sebanyak 10^6 spora/ mL, suhu inkubasi edamame fermentasi, suhu oven edamame non-fermentasi dan edamame fermentasi, penetapan kadar daidzein.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat gelas, timbangan analitik, *hot plate*, autoklaf (ALP), *Laminar air flow* (Airtech), mikroskop (Olympus BX53), mikropipet (Serena), hemasitometer (Neubar Improved), inkubator (Imperial III), oven (Memmert), soxhlet, ultrasonikator (Eimasonic), *sentrifuge* (Hermle), *rotary evaporator* (Heildoph), densitometer (*TLC-Scanner 3* Camag).

3.5.2 Bahan

Edamame, isolat *A. oryzae* (diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi dan Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Jember), isolat *R. oligosporus* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember), *Potato Dextrose Agar* (PDA) (BD difco), tween 80, akuades, lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ (Merck), *n*-heksan, etanol 70%, standar daidzein (Sigma-Aldrich), etil asetat, asam asetat, diklorometana, metanol..

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi Edamame Non-Fermentasi

Sebanyak 500 gram edamame direndam dalam air panas lalu kulit ari edamame dihilangkan. Selanjutnya edamame disterilisasi dengan suhu 121° C selama 15 menit. Edamame yang telah disterilisasi dipotong menjadi bagian-bagian kecil, dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60° C sampai edamame kering. Edamame yang telah kering selanjutnya diblender dan diayak.

3.6.2 Peremajaan Isolat *A. oryzae*

Peremajaan isolat *A. oryzae* dilakukan dengan cara mengambil *A. oryzae* menggunakan ose steril lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media miring *potato dextrose agar*. Selanjutnya media miring tersebut diinkubasi selama 1 hari dengan suhu 30° C.

3.6.3 Peremajaan Isolat *R. oligosporus*

Peremajaan isolat *R. oligosporus* dilakukan dengan cara mengambil *R. oligosporus* menggunakan ose steril lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media miring *potato dextrose agar*. Selanjutnya media miring tersebut diinkubasi selama 3 hari dengan suhu 30° C.

3.6.4 Pembuatan Suspensi Spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus*

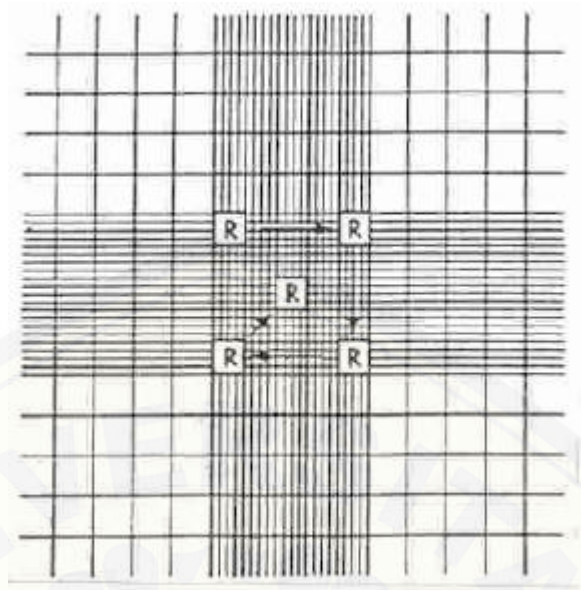
Pembuatan suspensi spora dilakukan dengan cara mengambil campuran tween 80 dan akuades (1:100) sebanyak 10 mL lalu dituang ke dalam tabung yang terdapat jamur *A. oryzae* dan *R. oligosporus*. Spora jamur diambil dengan cara mengeruk jamur menggunakan ose secara hati-hati. Selanjutnya suspensi dituangkan ke dalam tabung reaksi steril dan diresuspensi menggunakan mikropipet.

3.6.5 Perhitungan Kepadatan Spora

Perhitungan kepadatan spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* dilakukan dengan menggunakan alat hemasitometer. Suspensi spora *A. oryzae* dan *R. oligosporus* yang digunakan adalah suspensi yang mempunyai kepadatan spora masing-masing sebanyak 10^6 spora/ mL.

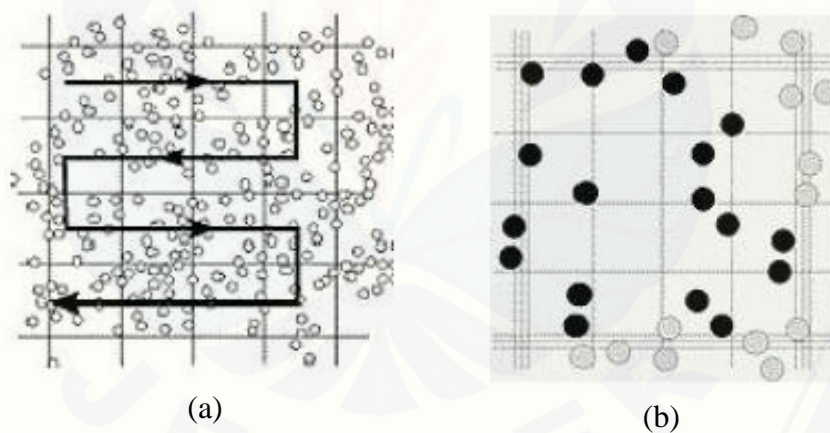
Tahapan perhitungan kepadatan spora sebagai berikut:

- a. Sebanyak 10 μ L suspensi spora dimasukkan ke dalam kamar hitung hemasitometer pada tepi kamar hitung
- b. Jumlah spora dihitung di bawah mikroskop dan spora yang dihitung terdapat dalam kotak hitung (R) (Gambar 3.2)



Gambar 3.2 Kamar hitung haemasitometer (Hansen, 2000)

- c. Spora yang dihitung mengikuti alur seperti gambar berikut dan spora yang terdapat pada garis batas hanya dihitung pada garis atas dan kiri.



Gambar 3.3 Cara menghitung spora menggunakan hemasiometer (a) alur menghitung spora (b) cara menghitung spora (● menunjukkan spora yang dihitung, ○ menunjukkan spora yang tidak dihitung) (Tim QC APH, 2009)

- d. Apabila jumlah spora telah diketahui maka kepadatan spora dihitung menggunakan rumus berikut (Persamaan 3.1):

$$N = \frac{x}{t(mm) \times d \times l(mm^2)} \times 10 \dots \text{(Persamaan 3.1 Perhitungan jumlah spora)}$$

Keterangan :

N : jumlah spora/ mL

X : rata-rata jumlah spora yang dihitung

l : Luas kotak hitung

t : kedalaman bidang hitung (0.1 mm)

d : Faktor pengenceran

10 : Volume suspensi yang diambil ($10 \mu\text{L} = 10 \text{ mm}^3$)

- e. Apabila kepadatan spora yang didapatkan lebih dari 10^6 spora maka dilakukan pengenceran menggunakan rumus berikut (Persamaan 3.2):

$$N1V1 = N2V2 \dots \text{(Persamaan 3. 2 Perhitungan pengenceran spora)}$$

3.6.6 Preparasi Edamame Fermentasi

Sebanyak 500 gram edamame direndam dalam air panas lalu kulit ari edamame dihilangkan. Ditimbang edamame sebanyak 50 gram dan dibungkus dengan menggunakan kertas saring. Selanjutnya edamame disterilisasi dengan suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan. Ditambahkan inokulum jamur *A. oryzae* sebanyak 0.5 mL dan *R. oligosporus* sebanyak 0.5 mL pada edamame yang terbungkus. Edamame yang telah ditambahkan inokulum selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C . Fermentasi dilakukan untuk hari 1, 2, 3 dan 4. Edamame yang telah diinkubasi dipotong menjadi bagian-bagian kecil, dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C sampai edamame kering. Edamame yang telah kering selanjutnya diblender dan diayak.

3.6.7 Penghilangan Lemak (*Defatting*)

Proses penghilangan lemak edamame dilakukan dengan menggunakan soxhlet dan pelarut yang digunakan *n*-heksan. Ditimbang serbuk edamame non-fermentasi dan serbuk edamame fermentasi sebanyak 40 gram. Jumlah *n*-heksan yang digunakan adalah 200 mL (1:5). Proses penghilangan lemak berlangsung selama 3 jam. Setelah proses selesai, serbuk diangin-anginkan semalaman.

3.6.8 Pembuatan Ekstrak Edamame

Ekstraksi edamame dilakukan dengan cara menimbang serbuk edamame yang telah dilakukan proses penghilangan lemak sebanyak 40 gram dan

dilarutkan dalam 240 mL etanol 70% (1:6). Ekstraksi dilakukan menggunakan metode ultrasonikasi. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali dengan menggunakan pelarut yang baru dan volume yang sama. Selanjutnya edamame yang telah diekstraksi lalu disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 2600 rpm. Residu diambil untuk dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator*.

3.6.9 Optimasi Kondisi Analisis

Terdapat tiga kondisi analisis yang akan dioptimasi yaitu optimasi eluen, optimasi panjang gelombang dan optimasi konsentrasi uji analit.

a. Optimasi Eluen

Optimasi eluen dilakukan dengan cara melarutkan standar daidzein dan sampel pada konsentrasi tertentu. Selanjutnya ditotolkan standar dan sampel pada lempeng sebanyak 4 μ L. Lempeng diekspose menggunakan masing-masing eluen. Setelah dilakukan ekspose, lempeng *discanning* pada panjang gelombang 266 nm. Eluen yang digunakan untuk optimasi eluen yaitu

n-heksana : etil asetat (0,5:6)

n-heksana : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15)

diklorometana : asam asetat : etil asetat (9,5:9,5:1)

Eluen yang dipilih adalah eluen yang mempunyai nilai *theoretical plate number* (N) paling besar, nilai *height equivalent a theoretical plate* (HETP) paling kecil, nilai resolusi (*Rs*) > 1.5 dan dapat menghasilkan puncak kromatogram yang simetris (Wulandari, 2016).

b. Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan pada area panjang gelombang 200-400 nm dan panjang gelombang yang dipilih adalah panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum paling tinggi. Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan cara *scanning* noda yang terbentuk dengan menggunakan densitometer dan *software* program winCATS.

c. Optimasi Konsentrasi Uji

Optimasi konsentrasi uji dibuat menggunakan tiga titik konsentrasi uji. Penentuan konsentrasi uji didasarkan pada hasil dari optimasi eluen, dimana

hasil tersebut menunjukkan perkiraan kandungan daidzein pada ekstrak etanol edamame. Pembuatan sampel uji dibuat dengan cara menimbang sejumlah tertentu ekstrak etanol edamame lalu dilarutkan dalam metanol sedangkan pembuatan larutan standar dibuat dengan cara melarutkan standar daidzein menggunakan metanol. Larutan standar dan larutan sampel kemudian ditotolkan pada lempeng KLT untuk selanjutnya dilakukan eluasi menggunakan eluen dan pada panjang gelombang yang telah dioptimasi. Konsentrasi uji yang dapat dipilih adalah konsentrasi yang mempunyai nilai N paling besar, nilai H paling kecil dan kemudahan dalam pembuatan sampel.

3.6.10 Validasi Metode Analisis

Beberapa parameter yang dilakukan pada validasi metode KLT-densitometri untuk penetapan kadar daidzein pada ekstrak etanol edamame yaitu linieritas, batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ), selektivitas/spesifisitas, presisi dan akurasi.

a. Linieritas

Uji linearitas dilakukan dengan cara membuat larutan standar daidzein dengan cara melarutkan standar daidzein pada metanol sampai menghasilkan 5 titik konsentrasi dengan rentang konsentrasi 0-200% dari konsentrasi uji hasil optimasi (Kusuma, 2015).

Selanjutnya larutan standar ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ sebanyak 6 µL. Lempeng yang telah ditotolkan standar dieluasi menggunakan eluen terpilih dari hasil optimasi. Dimasukkan lempeng ke dalam *chamber* yang telah berisi eluen lalu ditunggu hingga fase gerak mencapai batas atas lempeng. Setelah itu, lempeng di *scanning* pada panjang gelombang hasil optimasi (Kusuma, 2015). Selanjutnya, hasil yang digunakan dianalisis menggunakan *Validation Method of Analysis*. Parameter selektivitas yang dilihat adalah nilai r hitung lebih besar dibandingkan dengan r tabel, nilai $V_x < 5\%$, dan nilai X_p dibawah konsentrasi uji terkecil (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

b. Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Uji LOD dan LOQ dilakukan dengan cara melarutkan standar daidzein menggunakan metanol sampai menghasilkan 5 titik konsentrasi uji di bawah konsentrasi linearitas. Cara kerja yang dilakukan pada uji LOD dan LOQ sama dengan cara uji linieritas. Parameter LOD dan LOQ dengan persamaan regresi harus memenuhi parameter linearitas (Kusuma, 2015). Selanjutnya, hasil yang digunakan dianalisis menggunakan *Validation Method of Analysis*. Parameter selektivitas yang dilihat adalah nilai r hitung lebih besar dibandingkan dengan r tabel, nilai $V_x < 5\%$, dan nilai X_p dibawah konsentrasi uji terkecil (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

c. Selektivitas dan Spesifisitas

Uji selektivitas dan spesifisitas dilakukan dengan cara membuat larutan standar dan larutan sampel dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi konsentrasi uji. Cara kerja yang dilakukan pada uji selektivitas dan spesifisitas sama dengan cara uji linieritas. Parameter selektivitas dan spesifisitas yang dilihat adalah nilai R_s yang dihasilkan lebih dari 1,5 dan dilihat kromatogram yang dihasilkan.

d. Presisi

Uji presisi dilakukan dengan cara melarutkan standar pada metanol dengan konsentrasi sebanyak 5 titik konsentrasi. Dilarutkan sampel uji pada metanol sampai didapatkan konsentrasi sesuai hasil optimasi uji (6x replikasi). Cara kerja yang dilakukan pada uji presisi sama dengan yang dilakukan pada uji linieritas. Data $RSD \%recovery$ daidzein dalam sampel digunakan sebagai data repeatabilitas (Kusuma, 2015). Dihitung nilai parameter kepresisian dari data hasil *scanning* dan dicocokkan dengan rentang persyaratan presisi (Gambar 2.3).

e. Akurasi

Uji akurasi dibuat dengan cara menambahkan standar (*standart addition method*). Penambahan standar adisi dilakukan sebanyak 30, 45, dan 60% dari konsentrasi analit dalam sampel yang didapatkan dari hasil uji presisi.

Preparasi sampel dilakukan dengan cara menimbang sejumlah tertentu sampel lalu dilarutkan dengan metanol lalu dilakukan adisi dengan larutan standar konsentrasi 30, 45, dan 60%. Cara kerja uji akurasi sama dengan yang dilakukan pada uji linearitas. Data yang dilihat adalah nilai *recovery* (Kusuma, 2015). Data hasil uji akurasi dicocokkan dengan persyaratan akurasi (Gambar 2.4).

3.6.11 Penetapan Kadar Daidzein

Penetapan kadar daidzein damame dilakukan dengan menggunakan metode KLT–densitometri.

a. Pembuatan Standar Uji

Dibuat larutan induk dengan kadar 2000 µg/ mL dengan cara melarutkan standar daidzein pada 5 mL metanol. Lalu larutan induk diencerkan dengan konsentrasi yang memenuhi hasil linieritas.

b. Pembuatan Sampel Uji

Ekstrak kental ditimbang sejumlah 0,6 g lalu dilarutkan dalam metanol sebanyak 5 mL sehingga menghasilkan konsentrasi sampel uji berdasarkan hasil optimasi.

c. Kondisi Analisis

Fase gerak yang digunakan adalah eluen *n*-heksana : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15) dan fase diam yang digunakan adalah lempeng kromatografi lapis tipis silika gel GF₂₅₄. Noda yang terbentuk dilihat dengan menggunakan lampu UV 254 nm dan dihitung kadarnya dengan menggunakan densitometer dengan panjang gelombang 273 nm. Data yang didapatkan lalu dihitung kadar %b/b.

3.6.12 Analisis Data

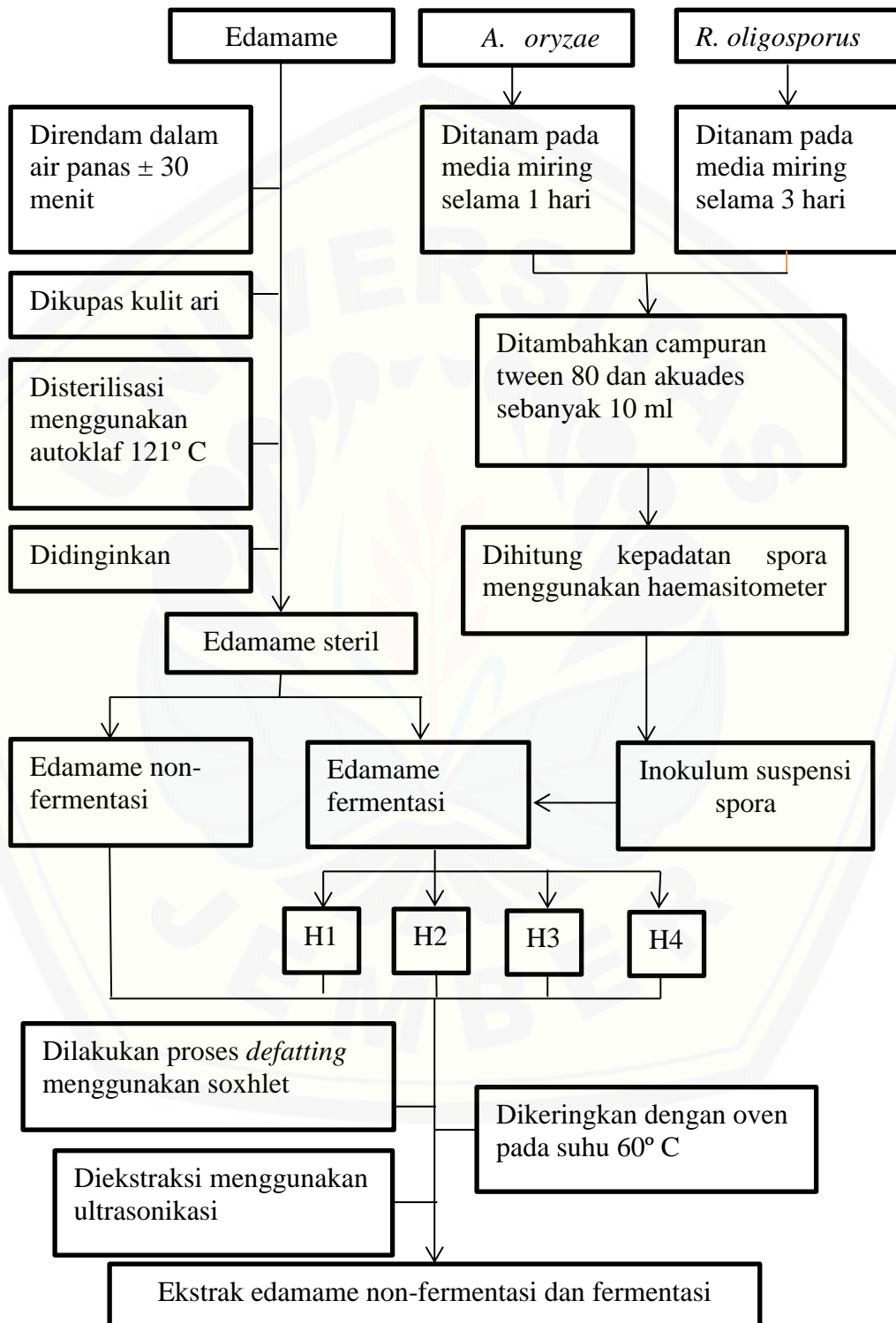
Analisis ini digunakan apabila data yang didapatkan telah homogen dan terdistribusi normal. Apabila data yang didapatkan tidak homogen atau tidak terdistribusi secara normal, maka dilakukan transformasi data terlebih dahulu. Data yang telah ditransformasi lalu diuji kembali normalitas dan homogenitasnya. Apabila data hasil transformasi telah homogen dan

terdistribusi secara normal, maka dapat dilanjutkan dengan menggunakan *One Way ANOVA*. Apabila hasil analisis data yang berasal dari *One Way ANOVA* berbeda signifikan, maka dilanjutkan dengan uji (*post hoc*) LSD (*least significant difference*). Data dikatakan memenuhi syarat apabila harga $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) (Prasetyowati, 2016). Apabila data yang dihasilkan masih belum homogen dan terdistribusi secara normal, maka dilakukan uji Kruskal-Wallis dan uji Mann-Whitney (Hamdani dan Setyawati, 2014).

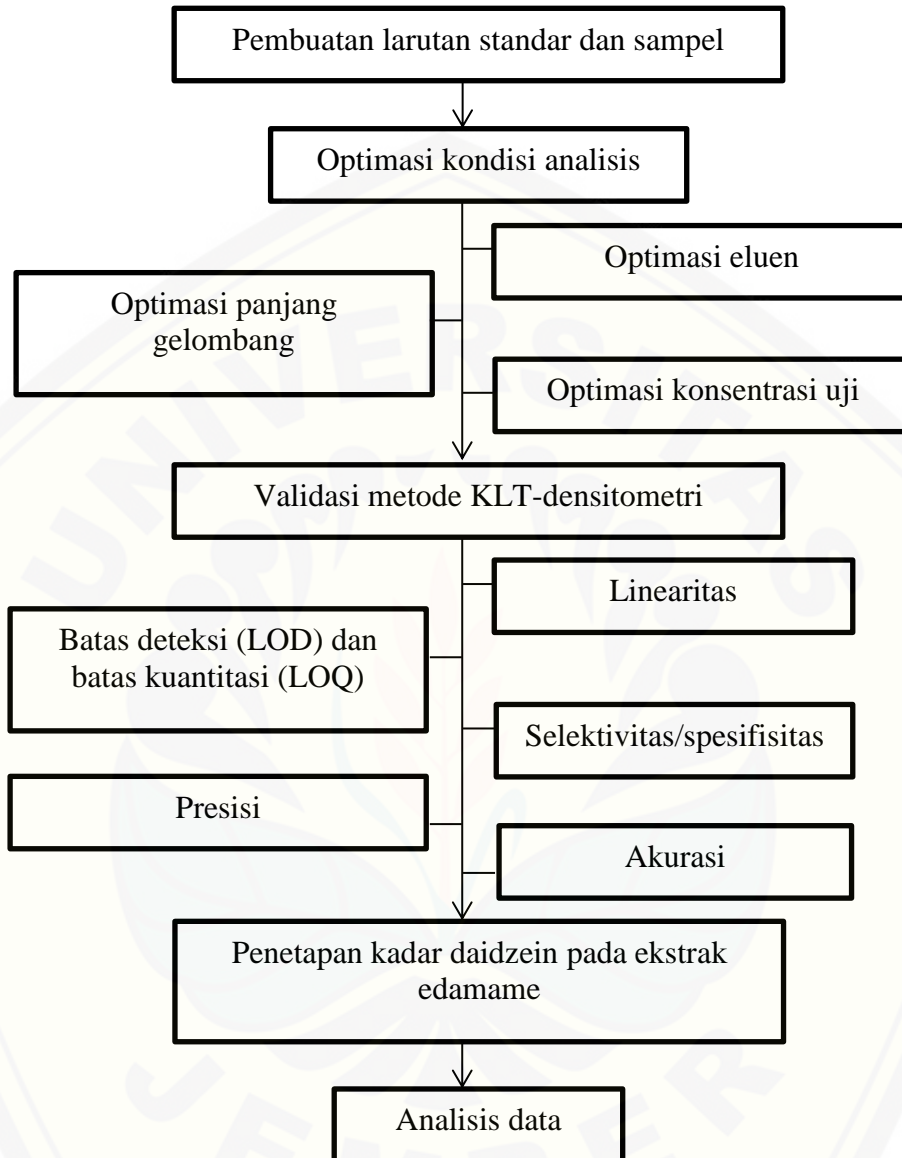


3.7 Skema Penelitian

3.7.1 Pembuatan Ekstrak Edamame Non-fermentasi dan Fermentasi



3.7.2 Validasi Metode dan Penetapan Kadar Daidzein Ekstrak Edamame



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

- a. Kondisi untuk penetapan kadar daidzein ekstrak edamame menggunakan metode KLT-Densitometri yaitu digunakan pelarut metanol p.a; fase diam silika gel 60 F₂₅₄; eluen *n*-heksana : etil asetat : asam asetat (2:5:0,15); panjang gelombang 273 nm; konsentrasi uji 0,12 g/ mL;
- b. Validitas metode analisis pada penetapan kadar daidzein ekstrak edamame menggunakan metode KLT-Densitometri memberikan hasil yang tidak valid, yaitu memenuhi parameter linieritas dengan nilai *r* sebesar 0,991, *V*_{x0} sebesar 3,068% dan *X*_p sebesar 55,675; memenuhi parameter LOD dan LOQ dengan nilai *r* sebesar 0,988, *V*_{x0} sebesar 4,628% dan *X*_p 23,694, nilai LOD sebesar 20,262 ng sedangkan LOQ sebesar 60,787 ng; tidak memenuhi parameter selektivitas dengan nilai *R*_s 0,8 dan 1,22; memenuhi persyaratan presisi dengan nilai RSD kurang dari 5,3%; memenuhi persyaratan akurasi dengan nilai *recovery* memenuhi rentang 90-107%;
- c. Proses fermentasi edamame menggunakan kombinasi *A.oryzae* dan *R. oligosporus* menurunkan kadar daidzein pada hari ke-1 fermentasi, tetapi kadar daidzein mengalami peningkatan pada hari ke-2, 3, dan 4 fermentasi. Kadar daidzein ekstrak edamame non-fermentasi dan terfermentasi berturut-turut adalah $0,0354 \pm 1,49 \times 10^{-3}$; $0,0099 \pm 1,19 \times 10^{-3}$; $0,0118 \pm 0,65 \times 10^{-3}$; $0,0618 \pm 10,64 \times 10^{-3}$ (b/b).

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan berdasarkan penelitian ini yaitu:

- a. Perlu penelitian lebih lanjut untuk memilih eluen yang tepat agar parameter validasi yaitu selektivitas dapat terpenuhi;

- b. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme aksi yang menyebabkan turunnya kadar daidzein pada edamame terfermentasi hari ke-1;
- c. Perlu dilakukan penelitian tentang optimasi volume masing-masing jamur untuk mengetahui pengaruh masing-masing jamur pada edamame yang difermentasi menggunakan kombinasi jamur *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*;
- d. Perlu penelitian lanjutan untuk menganalisis kadar daidzein pada ekstrak edamame yang difermentasi menggunakan jamur *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* apabila hari fermentasi diperpanjang menjadi lebih dari hari ke-4 fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Teknologi Industri Dan Hasil Pertanian Universitas Lampung*. 13(2):126–136.
- Badan Standardisasi Nasional. 2012. *Tempe : Persembahan Indonesia Untuk Indonesia*. Jakarta
- Born, H. 2006. Edamame: Vegetable Soybean. *ATTRA*. 1–4.
- Durward, E. 2017. *The Menopause: A Simple Guide to the Peri-Menopause, Menopause and Life Beyond the Menopause*. Great Britain: Bioforce.
- Dwinanto, S. 2011. Tempe. *Wacana Didaktika*. 1(6):25–32.
- Fardiaz. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Fitriah, A. M. 2018. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Genistein Dalam Ekstrak Edamame (*Glycine max* L. Merrill) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* Dan *Rhizopus oligosporus* Dengan KLT-Densitometri. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Gandjar, I. G. dan A. Rohman. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Hamdani, A. S. dan M. Setyawati. 2014. *Statistika Terapan*. Surabaya: IAIN Sunan Ampel Surabaya.
- Hansen, P. J. 2000. *Use of a Hemocytometer*. Florida: University of Florida.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 117(33):117–135.
- Hilmi, A. dan A. Darmawati. 2013. Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk Penetapan Kadar Kolkisin dalam Infus Daun Kembang Sungsang (*Gloriosa superba* linn .). *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*. 2(2):1–8.
- Jean, D. dan S. Carpenter. 2007. Determination of Plant Spacing and Time of Planting in the Production of Edamame Soybeans for Optimal Yield and Seed Isoflavone Content in Tennessee. University of Tennessee.

- Kemenkes RI. 2017. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2016*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kim, S. H. dan M. J. Park. 2012. Effects of Phytoestrogen on Sexual Development. *Korean Journal of Pediatrics*. 55(8):265–271.
- Konovsky, J., T. A. Lumpkin, dan D. McClary. 1994. Edamame : The Vegetable Soybean. *Understanding the Japanese Food and Agrimarket: A Multifaceted Opportunity*. 173–181.
- Kuligowski, M., K. Pawłowska, I. Jasińska-Kuligowska, dan J. Nowak. 2016. Isoflavone Composition, Polyphenols Content and Antioxidative Activity of Soybean Seeds during Tempeh Fermentation. *CyTA - Journal of Food*. 15(1):1–7.
- Kusuma, L. A. I. 2015. Formulasi dan Evaluasi Ekstrak Etanol Edamame (Glycine Max) Sebagai Sediaan Krim Pemutih Kulit. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Lee, S. H., M. H. Seo, dan D. K. Oh. 2013. Deglycosylation of Isoflavones in Isoflavone-Rich Soy Germ Flour by *Aspergillus oryzae* kacc 40247. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(49):12101–12110.
- Liggins, J., L. J. C. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, W. A. Coward, dan S. A. Bingham. 2018. Daidzein and Genistein Contents of Vegetables. *British Journal of Nutrition*. 84(2000):717–725.
- Liggins, J., A. Mulligan, S. Runswick, dan S. A. Bingham. 2002. Daidzein and Genistein Content of Cereals. *European Journal of Clinical Nutrition*. 56(10):961–966.
- Machida, M., O. Yamada, dan K. Gomi. 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from The History of Koji Mold and Exploration of It's Future. *DNA Research*. 15(4):173–183.
- Messina, M. 2016. Soy and Health Update: Evaluation of The Clinical and Epidemiologic Literature. *Nutrients*. 8(12):1–42.
- Murphy, P. A., K. Barua, dan C. C. Hauck. 2002. Solvent Extraction Selection in The Determination of Isoflavones in Soy Foods. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 777(1–2):129–138.
- Naufalia, A. N. 2018. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (Glycine Max) Terfermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* Dengan KLT-Densitometri. *Skripsi*. Universitas Jember.

- Nurhidayah, K. S. 2017. Peranan Kapang *Rhizopus oligosporus* pada Tempe Kacang Gude (Cajanuscajan) terhadap Kandungan Senyawa Isoflavon. *Prosiding Seminar Nasional SIMBIOSIS II*. 342–348.
- NZOR. tanpa tahun. *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn. <http://www.nzor.org.nz/names/247e8502-eac3-4577-a727-ee791320ef3e> [Diakses pada 19 Maret 2018a].
- NZOR. tanpa tahun. *Rhizopus microsporus* var. *ligosporus* (Saito) Schipper & Stalpers. <http://www.nzor.org.nz/names/7874c0e7-f2fe-4461-a856-a5c0f318cbdc> [Diakses pada 19 Maret 2018b].
- Praharani, S. R. 2015. Pengaruh Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Kadar Isoflavon Genistein Dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) In Vitro. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Prasetyowati, D. A. 2016. *Analisis Statistik (Teori Dan Aplikasi Menggunakan Spss)*. Palembang: Universitas Indo Global Mandiri.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Preedy, V. R. 2013. *Isoflavones : Chemistry, Analysis, Function and Effects*. United Kingdom: RSC Publishing.
- Pubchem. 2004a. DAIDZEIN. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281708#section=Top> [Diakses pada 14 Juli 2018].
- Pubchem. 2004b. GENISTEIN. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280961#section=Top> [Diakses pada 14 Juli 2018].
- Pubchem. 2005. GLYCITEIN. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5317750#section=Top> [Diakses pada 14 Juli 2018].
- Purwoko, T. 2004. Kandungan Isoflavon Aglikon pada Tempe Hasil Fermentasi *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* : Pengaruh Perendaman. *BioSMART*. 6(2):85–87.
- Purwoko, T., S. Pawiroharsono, dan I. Gandjar. 2001. Biotransformasi Isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* uicc 524. 3:7–12.
- Sani, R. N., F. C. Nisa, R. D. Andriani, dan J. M. Maligan. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*. 2(2):121–126.

- Segal, S. J. dan L. Mastroianni. 2003. *Hormone Use in Menopause and Male Andropause : A Choice for Women and Men*. New York: Oxford University Press.
- Seidlova-Wuttke, D., H. Jarry, dan W. Wuttke. 2013. Plant Derived Alternatives for Hormone Replacement Therapy (HRT). *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 16(1):35–45.
- Setiawan, A. 2014. Kedelai Jember Tembus Pasar Internasional. <http://setkab.go.id/kedelai-jember-tembus-pasar-internasional/> [Diakses pada 27 Maret 2018].
- Shurtleff, W. dan A. Aoyagi. 2009. *History of Edamame, Green Vegetable Soybeans, and Vegetable-Type Soybeans (1275 - 2009): Extensively Annotated Bibliography and Sourcebook*. United State: Soyinfo Center.
- Stanbury, P. F., A. Whitaker, dan S. J. Hall. 2013. Principles of Fermentation Technology. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 53(9):1689–1699.
- Sturdee, D. W. 2004. *The Facts of Hormone Therapy for Menopausal Women*. United Kingdom: The Parthenon Publishing Group.
- Sutatik. 2018. Validasi Metode KLT-Densitometri Dan Pengaruh Fermentasi *Aspergillus oryzae* Terhadap Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max*). *Skripsi*. Universitas Jember.
- Teekachunhatean, S., N. Hanprasertpong, dan T. Teekachunhatean. 2013. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds Grown in Thailand. *International Journal of Agronomy*. 2013
- Tim QC APH, G. J. 2009. *Modul Quality Control (QC) APH Golongan Jamur*. Surabaya: Balai Besar Pembenuhan dan Proteksi Tanaman Perkebunan.
- USDA. 2017. Full Report (All Nutrients): 45314665, EDAMAME, UPC: 046567015545. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/246397?manu=&fgcd=&ds=> [Diakses pada 1 April 2018].
- USDA. tanpa tahun. Plants Profile for *Glycine max* (Soybean). <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GLMA4> [Diakses pada 1 Maret 2018].
- Varney, H., J. A. N. M. Kriebs, dan C. L. Gegor. 2004. *Varney's Midwifery*. Edisi Fourth Edi. United State: Jones and Bartlett Publishers.

- Waksmundzka-Hajnos, M., J. Sherma, dan T. Kowalska. 2008. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. New York: CRC Press. *Chromatographic Science Series*.
- Wang, Q., X. Ge, X. Tian, Y. Zhang, J. Zhang, dan P. Zhang. 2013. Soy Isoflavone: The Multipurpose Phytochemical (Review). *Biomedical Reports*. 1(5):697–701.
- Widati, F. dan I. M. Hidayat. 2012. *Kedelai Sayur (Glycine max L . Merill)*. Bandung: Balai Penelitian Tanaman Sayuran.
- Wulandari, L. 2016. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Yunindarwati, E., E. U. Ulfa, E. Puspitasari, dan M. A. Hidayat. 2016. Penentuan Kadar Genistein dan Aktivitas Hambatan Tirosinase Kedelai (*Glycine max*) Terfermentasi *Aspergillus oryzae*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 14(1):1–7.
- Yusra, Azima F., Novelina, P. 2014. Isolasi dan Identifikasi Mikroflora. *Agritech*. 34(3):316–321.
- Yuwono, M. dan G. Indrayanto. 2005. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 32(5):241–260.

LAMPIRAN

A. PERHITUNGAN

A. 1 Perhitungan Kepadatan Suspensi Spora *Rhizopus oligosporus*

- a. Jumlah spora pada kotak hitung 1 = 12 spora
- b. Jumlah spora pada kotak hitung 2 = 21 spora
- c. Jumlah spora pada kotak hitung 3 = 12 spora
- d. Jumlah spora pada kotak hitung 4 = 38 spora
- e. Jumlah spora pada kotak hitung 5 = 30 spora
- f. Jumlah spora pada semua kotak hitung = 113
- g. Rata-rata jumlah spora = 22,6 spora
- h. Perhitungan kepadatan spora/mL

$$S = \frac{22,6}{0,0125 \times 0,1 \times 0,1} \times 10$$

$$S = 1,808 \times 10^3$$

A. 2 Perhitungan Kepadatan Suspensi Spora *Aspergillus oryzae*

- a. Jumlah spora pada kotak hitung 1 = 47 spora
- b. Jumlah spora pada kotak hitung 2 = 57 spora
- c. Jumlah spora pada kotak hitung 3 = 52 spora
- d. Jumlah spora pada kotak hitung 4 = 57 spora
- e. Jumlah spora pada kotak hitung 5 = 47 spora
- f. Jumlah spora pada semua kotak hitung = 260 spora
- g. Rata-rata jumlah spora = 52 spora
- h. Perhitungan kepadatan spora/ml

$$S = \frac{52}{0,0125 \times 0,1 \times 0,1} \times 10$$

$$S = 4,16 \times 10^3$$

A. 3 Pengenceran Suspensi Spora

- a. Spora
- Rhizopus oligosporus*

$$N1V1 = N2V2$$

$$10^6 \times x = 1,808 \times 10^6 \times 10 \text{ ml}$$

$x = 18,08 \text{ ml}$, penambahan *aquadest* yang dilakukan adalah 8,08 mL

- b. Spora
- Aspergillus oryzae*

$$N1V1 = N2V2$$

$$10^6 \times x = 4,16 \times 10^6 \times 10 \text{ ml}$$

$x = 41,6 \text{ ml}$, penambahan *aquadest* yang dilakukan adalah 31,6 mL

A. 4 Perhitungan Rendemen Ekstrak

- a. Edamame non fermentasi

$$\text{Berat serbuk kering} = 700 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = 67,83 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{67,83}{700} \times 100\% = 9,690\%$$

- b. Edamame terfermentasi hari 1

$$\text{Berat serbuk kering} = 37,16 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = 14,36 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{14,36}{37,16} \times 100\% = 38,64\%$$

- c. Edamame terfermentasi hari 2

$$\text{Berat serbuk kering} = 37,19 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = 24,86 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{24,86}{37,19} \times 100\% = 66,85\%$$

- d. Edamame terfermentasi hari 3

$$\text{Berat serbuk kering} = 30,83 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = 16,81 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{16,81}{30,83} \times 100\% = 54,52\%$$

e. Edamame terfermentasi hari 4

$$\text{Berat serbuk kering} = 23,27 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = 10,70 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{10,70}{23,27} \times 100\% = 45,98\%$$

A. 5 Pengenceran Standar Daidzein

a. Larutan baku induk daidzein

$$\text{Massa daidzein} = 10 \text{ mg}$$

$$\text{Volume} = 5 \text{ mL}$$

Konsentrasi larutan baku induk

$$\frac{10 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 2000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

b. Pembuatan larutan induk daidzein

i. Larutan induk 400 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 2000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 400 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

ii. Larutan induk 200 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 200 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

iii. Larutan induk 100 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{1,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

iv. Larutan induk 90 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{1,125 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 90 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

v. Larutan induk 70 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{0,875 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 70 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

vi. Larutan induk 50 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{0,625 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

vii. Larutan induk 20 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 200 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

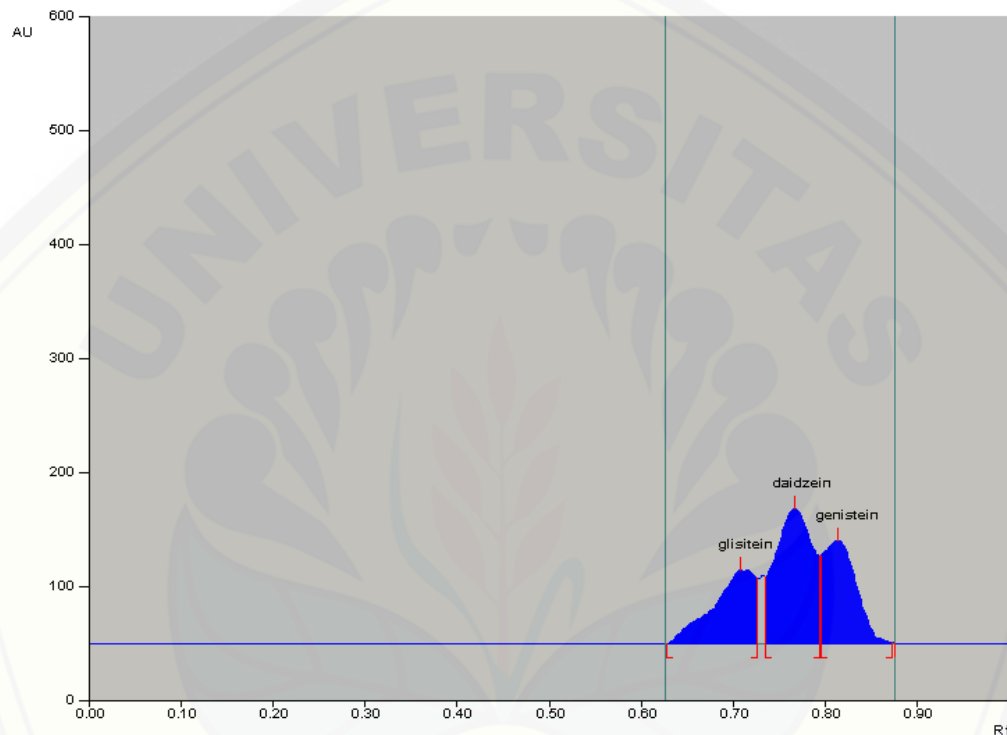
viii. Larutan induk 10 µg/ mL

$$\frac{0,25 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 200 \text{ µg/ mL} = 10 \text{ µg/ mL}$$

B. DATA HASIL PENEITIAN

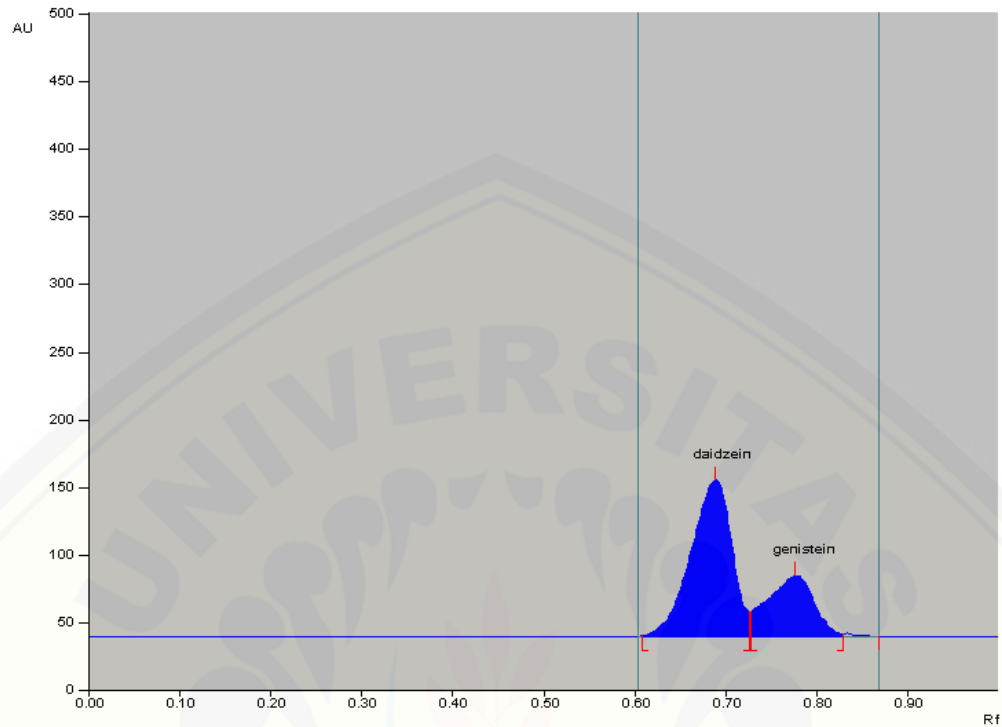
B. 1 Optimasi Eluen

a. *n*-heksana : etil asetat (0,5:6)



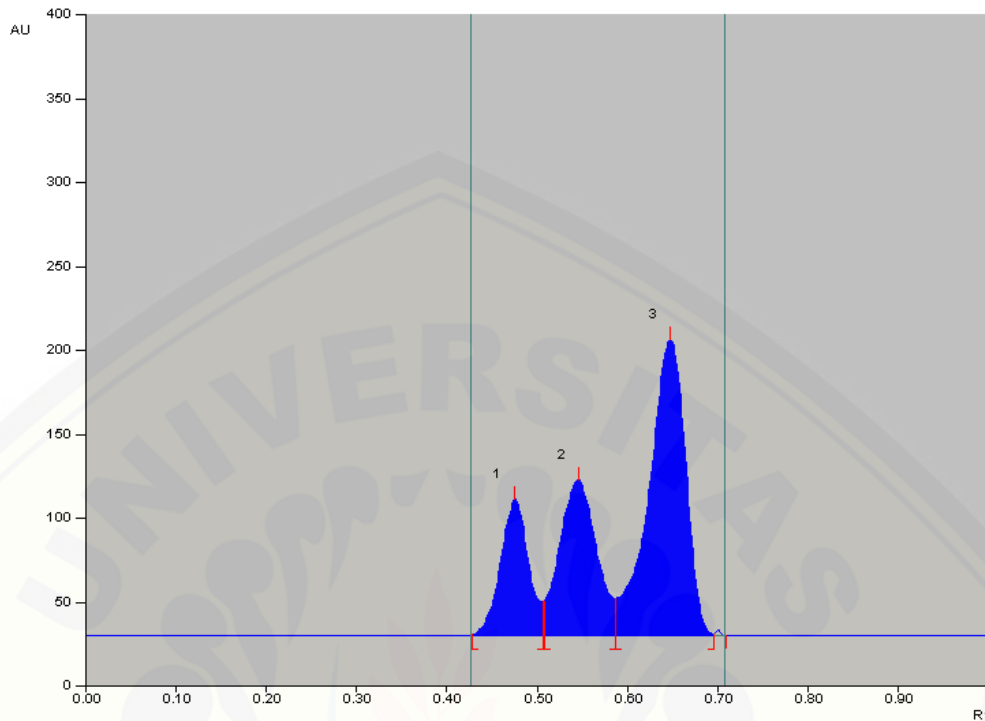
Peak	Start position	Max position	End position	N	H	Rs _{1,2}	Rs _{2,3}
2	0,73	0,77	0,79	2635,111	0,034	0,075	0,615

b. diklrometana : etil asetat : asam asetat (9.5:9.5:1)



Peak	Start position	Max position	End position	N	H	Rs
1	0,61	0,69	0,73	529,00	0,170	0,818

c. *n*-heksan : etil asetat (2:5)



Peak	Start position	Max position	End position	N	H	RS _{1,2}	RS _{2,3}
2	0,51	0,55	0,59	754,250	0,119	1	1,111

Contoh perhitungan :

$$N = 16 \left(\frac{0,55}{0,59-0,51} \right)^2 = 756,25$$

$$H = \frac{90}{756,25} = 0,119$$

$$RS_{1,2} = \frac{(0,55-0,47)}{(0,51-0,43)+(0,59-0,51)} = 1$$

$$RS_{2,3} = \frac{(0,65-0,55)}{(0,59-0,51)+(0,69-0,59)} = 1,111$$

B. 2 Optimasi Konsentrasi Uji

a. Dalam 0,5 g ekstrak terdapat 0,37 mg daidzein (6 µL)

$$\frac{80}{100} \times 0,37 = 0,296 \text{ mg daidzein}$$

$$\frac{120}{100} \times 0,37 = 0,44 \text{ mg daidzein}$$

b. Data perbandingan nilai N dan H pada konsentrasi uji yang berbeda

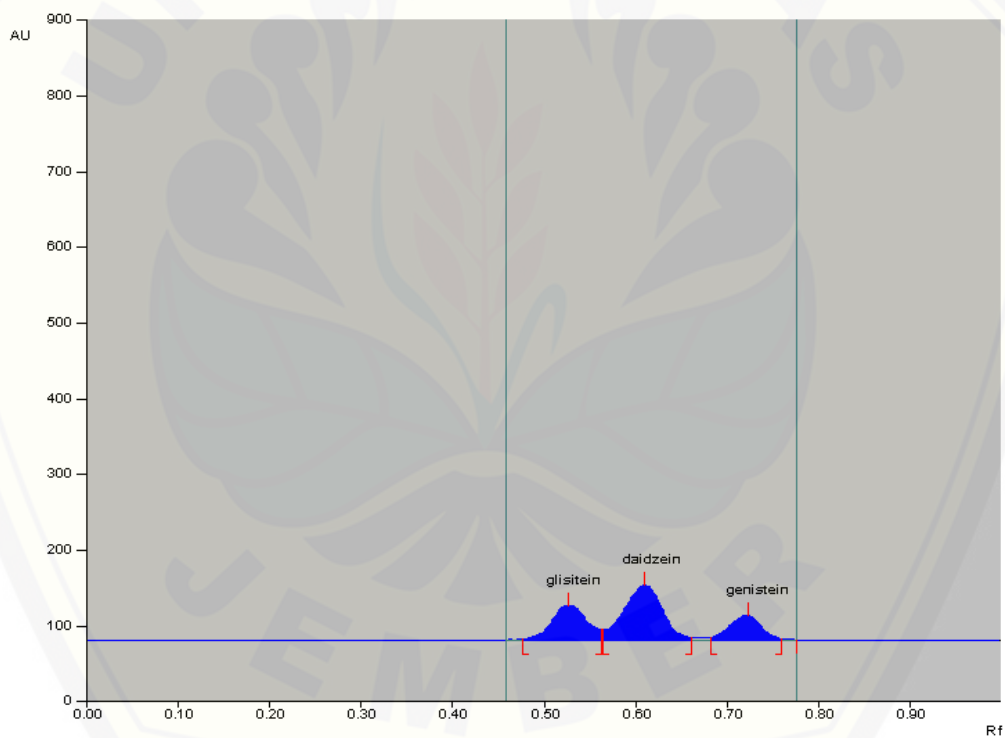
Konsentrasi (g/ mL)	Start position	Max position	End position	N	H
0,08	0,61	0,63	0,71	635,040	0,142
0,1	0,60	0,63	0,71	524,826	0,171
0,12	0,61	0,63	0,70	784,000	0,115

Contoh perhitungan :

$$N = 16 \left(\frac{0,63}{0,70 - 0,61} \right)^2 = 784,000$$

$$H = \frac{90}{784,000} = 0,115$$

B. 3 Resolusi puncak daidzein



Peak	Start position	Max position	End position	Rs _{1,2}	Rs _{2,3}
1	0,48	0,53	0,56	0,89	[REDACTED]
2	0,56	0,61	0,66		
3	0,68	0,72	0,76	[REDACTED]	1,22

Contoh perhitungan :

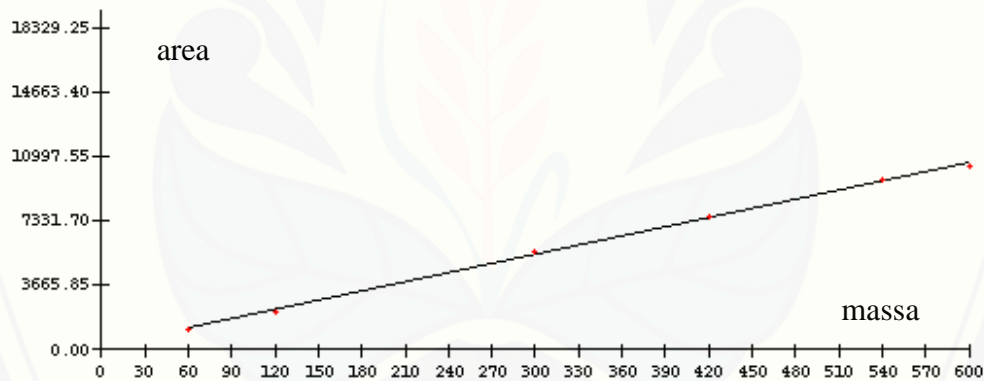
$$RS_{1,2} = \frac{(0,61-0,53)}{(0,56-0,48)+(0,66-0,56)} = 0,89$$

$$RS_{2,3} = \frac{(0,72-0,61)}{(0,66-0,56)+(0,76-0,68)} = 1,22$$

B. 4 Data presisi

a. Kurva baku uji repeatabilitas hari ke-1

Massa (ng)	Area
60	1.204,09
120	2.099,24
300	5.607,31
420	7.586,21
540	9.723,09
600	10.441,24



Line equation : $Y = 158.84010000 + 17.50399000X$
 Correlation coefficient : 0.99911750
 Vx0 value : 3.04381700%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = 158.84010000 + 17.50399000X$
 Correlation coefficient : 0.99911750
 Sy value : 181.14840000
 vx0 value : 3.04381700%
 xp value : 55.24848000

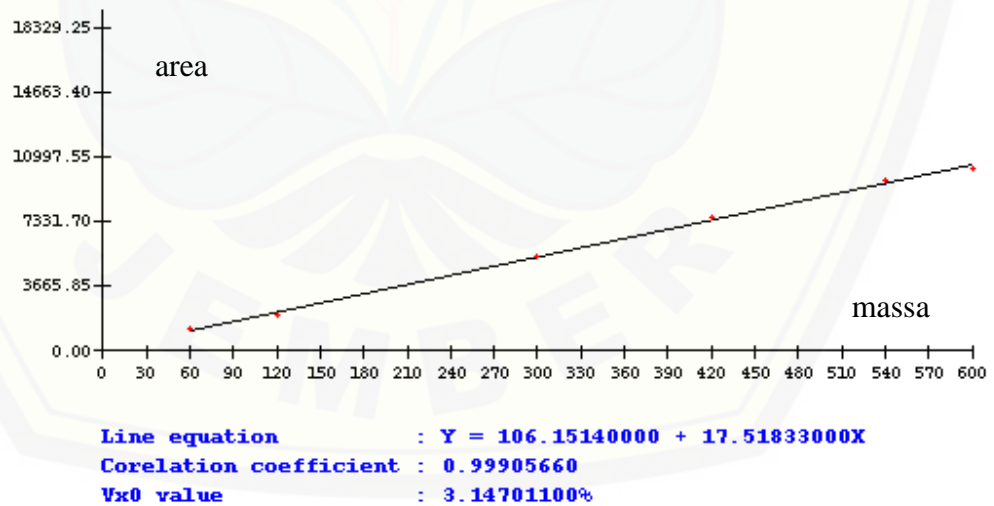
The correlation coefficient is fulfilled the requirement (> 0.99)
 The vx0 value is fulfilled the requirement (0% to 5%)
 The xp value is ok (< 60.00000000)

b. Hasil uji repeatabilitas kadar daidzein hari ke-1

Penimbangan (mg)	Area	Massa percobaan (mg)	Kadar (% b/b)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
600,2	4.238,47	0,194	0,032	0,032	0,001	4,486
609,3	4.417,58	0,203	0,033			
604,9	4.175,90	0,191	0,032			
600,7	4.299,89	0,197	0,033			
605,0	4.548,50	0,209	0,034			
608,3	4.027,49	0,184	0,030			

c. Kurva baku uji repeatabilitas hari ke-2

Massa (ng)	Area
60	1.265,46
120	2.022,22
300	5.352,00
420	7.593,53
540	9.740,43
600	10.400,66



Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = 106.15140000 + 17.51833000X$
 Correlation coefficient : 0.99905660
 Sy value : 187.44330000
 Vx0 value : 3.14701100%
 xp value : 57.07667000

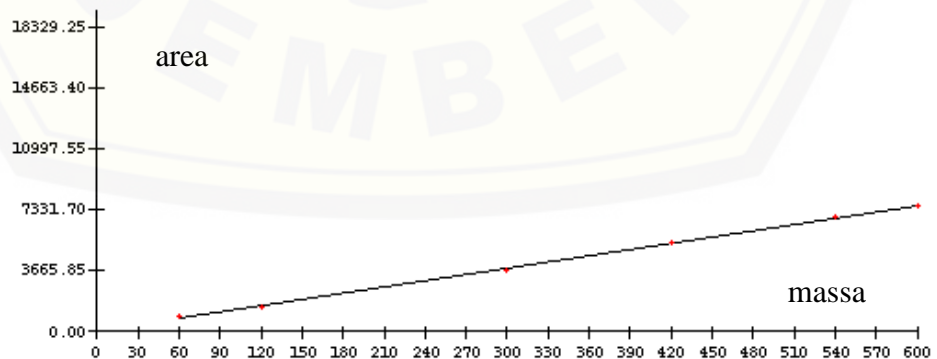
The correlation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)
 The vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)
 The xp value is OK (< 60.00000000)

d. Hasil uji repeatabilitas kadar daidzein hari ke-2

Penimbangan (mg)	Area	Massa percobaan (mg)	Kadar (% b/b)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
600,2	4.952,6	0,230	0,038	0,037	0,001	2,889
609,3	4.945,4	0,230	0,038			
604,9	4.924,4	0,229	0,038			
600,7	4.832,6	0,224	0,037			
605,0	4.597,9	0,213	0,035			
608,3	4.929,8	0,229	0,038			

e. Kurva baku uji repeatabilitas hari ke-3

Massa (ng)	Area
60	923,05
120	1.516,17
300	3.677,83
420	5.389,59
540	6.897,91



Line equation : $Y = 51.78536000 + 12.61380000X$
 Corelation coefficient : 0.99943450
 Vx0 value : 2.43586700%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = 51.78536000 + 12.61380000X$
 Correlation coefficient : 0.99943450
 Sy value : 104.46680000
 vx0 value : 2.43586700%
 xp value : 44.41985000

The correlation coefficient is fulfilled the requirement (> 0.99)
 The vx0 value is fulfilled the requirement (0% to 5%)
 The xp value is OK (< 60.00000000)

f. Hasil uji repeatabilitas kadar daidzein hari ke-3

Penimbangan (mg)	Area	Massa percobaan (mg)	Kadar (% b/b)	Rata-rata (%)	SD (%)	RSD (%)
600,2	4.291,1	0,280	0,047	0,049	0,001	3,182
609,3	4.654,9	0,304	0,050			
604,9	4.597,9	0,300	0,050			
600,7	4.377,9	0,286	0,047			
605,0	4.591,4	0,300	0,049			
608,3	4.725,7	0,309	0,051			

Contoh perhitungan :

Kurva baku $y=51,78536+12,6138x$

Massa percobaan (ng)

$$4291,1 = 51,78536 + 12,61x$$

$$x = 336,089 \text{ ng}$$

Massa percobaan (mg)

$$\frac{336,089}{6 \mu l} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,280 \text{ mg}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{0,280}{600,2} \times 100 = 0,047\%$$

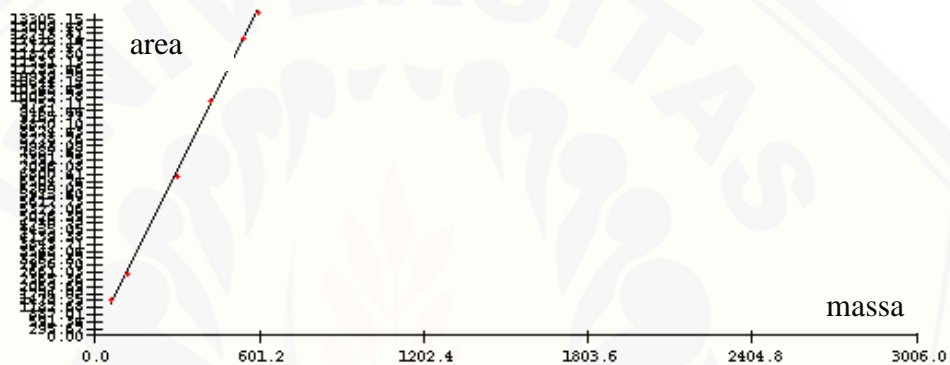
g. Hasil uji presisi antara kadar daidzein

Hari ke-	Kadar (% b/b)	RSD (%)
1	0.032	4,48
2	0,037	2,89
3	0,049	3,18
Rata-rata	0,040	03,52

B. 5 Data Akurasi

a. Kurva baku uji akurasi

Massa (ng)	Area
60	1.478.35
120	2.599.63
300	6.718.78
420	9.890.62
540	12.507.46
600	13.569.71



Line equation : $Y = -13.36689000 + 22.96311000X$
 Corelation coefficient : 0.99930550
 vx0 value : 2.69995600%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = -13.36689000 + 22.96311000X$
 Corelation coefficient : 0.99930550
 sy value : 210.79800000
 vx0 value : 2.69995600%
 xp value : 49.13601000

The Corelation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)
 The vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)
 The xp value is ok (< 60.00000000)

b. Data hasil akurasi

Akurasi (%)	Penimbangan (mg)	Area	Massa percobaan (mg)	Massa teoritis (mg)	Recovery (%)
30	600,9	8.341,26	0,304	0,418	76,200
	600,9	8.924,84	0,325	0,418	
	600,9	8.942,59	0,326	0,418	
45	601,1	12.901,04	0,468	0,508	92,073
	601,1	12.932,49	0,469	0,508	
	601,1	12.854,23	0,466	0,508	
60	600,9	18.243,80	0,660	0,598	109,589
	600,9	18.297,91	0,662	0,598	
	600,9	17.823,03	0,644	0,598	

Contoh perhitungan :

Kurva baku $y = -13,3669 + 22,96311x$

Massa percobaan (ng)

$$6314,74 = -13,3669 + 22,96311x$$

$$x = 277,899 \text{ ng}$$

Massa percobaan (mg)

$$\frac{277,899}{6 \mu l} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

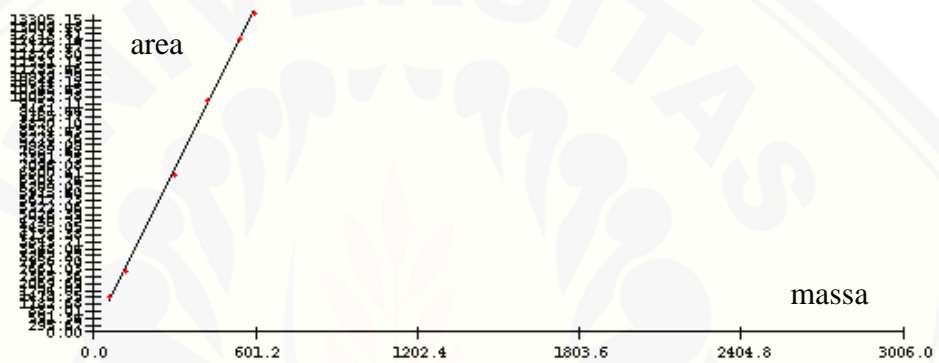
$$x = 0,280 \text{ mg}$$

$$\% \text{recovery} = \frac{0,280}{600,2} \times 100 = 0,047\%$$

B. 6 Penetapan kadar daidzein

a. Kurva penetapan kadar edamame terfermentasi

Massa (ng)	Area
60	1.478,35
120	2.599,63
300	6.718,78
420	9.890,62
540	12.507,46
600	13.569,71



Line equation : $Y = -13.36689000 + 22.96311000X$
 Corelation coefficient : 0.99930550
 Vx0 value : 2.69995600%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = 346.21730000 + 25.35266000X$
 Corelation coefficient : 0.99904840
 sy value : 272.45710000
 vx0 value : 3.16079000%
 xp value : 57.32057000

The correlation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)
 The vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)
 The xp value is OK (< 60.00000000)

b. Kurva penetapan kadar edamame terfermentasi

Massa (ng)	Area
60	1.851.9
120	3.237.74
300	7.970.11
420	11.465.05
540	13.879.69
600	15.392.24



Line equation : $Y = 346.21730000 + 25.35266000X$
 Corelation coefficient : 0.99904840
 Vx0 value : 3.16079000%

Method : Linearity
 Probability : 95%
 Number of data : 6
 Line equation : $Y = 346.21730000 + 25.35266000x$
 Corelation coefficient : 0.99904840
 Sy value : 272.45710000
 vx0 value : 3.16079000%
 xp value : 57.32057000

The correlation coefficient is fullfilled the requirement (> 0.99)
 The vx0 value is fullfilled the requirement (0% to 5%)
 The xp value is OK (< 60.00000000)

c. Hasil uji penetapan kadar daidzein hari ke-3

Waktu fermentasi (hari)	Penimbangan (mg)	Area	Massa percobaan (mg)	Kadar (% b/b)	Rata-rata (%)	SD (%)
0	602,8	5.724,20	0,210	0,035	0,035	0,0015
	601,7	6.080,90	0,223	0,037		
	601,7	5.604,20	0,206	0,034		
1	601,4	2.039,00	0,055	0,009	0,010	0,0012
	602,7	2.017,60	0,055	0,010		
	601,4	2.403,80	0,068	0,011		
2	600,3	2.521,40	0,071	0,011	0,012	0,0002
	600,2	2.469,10	0,070	0,012		
	600,1	2.520,60	0,071	0,013		
3	604,4	3.105,40	0,091	0,015	0,016	0,006
	602,6	3.209,60	0,094	0,016		
	603,1	3.337,51	0,098	0,016		
4	602,1	9.412,59	0,298	0,049	0,0612	0,0107
	603,6	12.805,1	0,410	0,068		
	603,4	12.151,3	0,411	0,068		

Contoh perhitungan :

Kurva baku $y=346,2173+25,35266x$

Massa percobaan (ng)

$$2039,0 = 346,2173 + 25,3526x$$

$$x = 66,77 \text{ ng}$$

Massa percobaan (mg)

$$\frac{66,77}{6 \mu l} = \frac{x}{5 \text{ ml}}$$

$$x = 0,056 \text{ mg}$$

$$\% \frac{b}{b} = \frac{0,056}{600,2} \times 100 = 0,009\%$$

B. 7 Hasil data ANOVA

a. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		BB
N		15
Normal Parameters ^a	Mean	.02689
	Std. Deviation	.020765
Most Extreme Absolute Differences	Positive	.295
	Negative	-.196
	Kolmogorov-Smirnov Z	1.143
Asymp. Sig. (2-tailed)		.147
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	95% Confidence Interval Lower Bound	.111
	Upper Bound	.123

b. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

BB

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
13.062	4	10	.001

c. Uji Kruskal Wallis

Test Statistics^{b,c}

		BB
Chi-Square		13.524
Df		4
Asymp. Sig.		.009
Monte Carlo Sig. Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	.000
	Upper Bound	.000
		.000 ^a

d. Uji Mann-Whitney

- Non-fermentasi dan fermentasi hari ke-1

Test Statistics^a

			BB
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			6.000
Z			-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)			.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]			.100 ^a
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.100 ^b
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.094
		Upper Bound	.105
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound	.044
		Upper Bound	.052
	Sig.		.048 ^b

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1314643744.

c. Grouping Variable: SAMPEL

- Non-fermentasi dan fermentasi hari ke-2

Test Statistics^a

			BB
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			6.000
Z			-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)			.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]			.100 ^a
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.107 ^b
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.101
		Upper Bound	.113
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound	.051
		Upper Bound	.060
	Sig.		.055 ^b

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 624387341.

c. Grouping Variable: SAMPEL

- Non-fermentasi dan fermentasi hari ke-3

Test Statistics ^c				BB
Mann-Whitney U				.000
Wilcoxon W				6.000
Z				-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)				.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]				.100 ^a
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.			.100 ^b
		95% Confidence Interval	Lower Bound	.095
			Upper Bound	.106
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound		.044
		Upper Bound		.053
		Sig.		.049 ^b

a. Not corrected for ties.

- Non-fermentasi dan fermentasi hari ke-4

Test Statistics ^c				BB
Mann-Whitney U				.000
Wilcoxon W				6.000
Z				-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)				.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]				.100 ^a
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.			.099 ^b
		95% Confidence Interval	Lower Bound	.093
			Upper Bound	.105
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound		.045
		Upper Bound		.053
		Sig.		.049 ^b

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1502173562.

c. Grouping Variable: SAMPEL

- Fermentasi hari ke-1 dan fermentasi hari ke-2

Test Statistics ^a			BB
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			6.000
Z			-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)			.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]			.100 ^b
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.100 ^b
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.094
		Upper Bound	.106
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound	.043
		Upper Bound	.051
	Sig.		.047 ^b

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 743671174.

c. Grouping Variable: SAMPEL

- Fermentasi hari ke-1 dan fermentasi hari ke-3

Test Statistics ^a			BB
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			6.000
Z			-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)			.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]			.100 ^b
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.101 ^b
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.095
		Upper Bound	.107
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound	.049
		Upper Bound	.057
	Sig.		.053 ^b

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 957002199.

c. Grouping Variable: SAMPEL

- Fermentasi hari ke-1 dan fermentasi hari ke-4

Test Statistics^c

			BB
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			6.000
Z			-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)			.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]			.100 ^a
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.102 ^b
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.096
		Upper Bound	.108
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound	.044
		Upper Bound	.053
	Sig.		.048 ^b

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 112562564.

c. Grouping Variable: SAMPEL

- Fermentasi hari ke-2 dan fermentasi hari ke-3

Test Statistics^c

			BB
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			6.000
Z			-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)			.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]			.100 ^a
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.100 ^b
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.095
		Upper Bound	.106
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound	.045
		Upper Bound	.053
	Sig.		.049 ^b

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 221623949.

c. Grouping Variable: SAMPEL

- Fermentasi hari ke-2 dan fermentasi hari ke-4

Test Statistics^a

			BB
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			6.000
Z			-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)			.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]			.100 ^b
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.100 ^b
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.094
		Upper Bound	.106
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound	.042
		Upper Bound	.051
	Sig.		.046 ^b

- a. Not corrected for ties.
- b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 303130861.
- c. Grouping Variable: SAMPEL

- Fermentasi hari ke-3 dan fermentasi hari ke-4

Test Statistics^a

			BB
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			6.000
Z			-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)			.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]			.100 ^a
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.103 ^b
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.097
		Upper Bound	.109
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	95% Confidence Interval	Lower Bound	.050
		Upper Bound	.059
	Sig.		.054 ^b

- a. Not corrected for ties.
- b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 92208573.
- c. Grouping Variable: SAMPEL